

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

PAPEL DE LA METILACIÓN DEL ADN EN LA ACTIVACIÓN INICIAL DE GENES HEMATOPOIÉTICOS Y MUSCULARES



TESIS DOCTORAL

DANIELA PALACIOS GARCÍA
Madrid, 2004

M
TESIS
2505

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

PAPEL DE LA METILACIÓN DEL ADN
EN LA ACTIVACIÓN INICIAL DE GENES
HEMATOPOIÉTICOS Y MUSCULARES

UNIVERSIDAD AUTONOMA MADRID
REGISTRO GENERAL

Entrada 01 Nº. 200400000284
13/01/04 11:21:16



TESIS DOCTORAL

R.F.M. 23777

DANIELA PALACIOS GARCÍA

Madrid, 2004

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

**PAPEL DE LA METILACIÓN DEL ADN
EN LA ACTIVACIÓN INICIAL DE GENES
HEMATOPOIÉTICOS Y MUSCULARES**

Memoria presentada por DANIELA PALACIOS GARCÍA, licenciada en
Bioquímica, para optar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de
Madrid.

Directora de tesis: Dra. Joan Boyes
Tutor: Rafael Garesse Alarcón
Institute of Cancer Research, Londres

Section of Gene Function and Regulation

The Institute of Cancer Research, Chester Beatty Laboratories,
237 Fulham Road, London, SW3 6JB
Tel: 020 7153 5410 Fax: 020 7153 5514
Joan Boyes Email: Joan.Boyes@icr.ac.uk

I, Joan Boyes, Ph.D. in Biochemistry, Teacher of the University of London and Principal Investigator of the Chromatin Activation group at the Institute of Cancer Research, London,

CERTIFIES: that Ms. Daniela Palacios García, Graduate in Biochemistry by the Universidad Autónoma de Madrid, has done, under my supervision, the following work:

PAPEL DE LA METILACIÓN DEL ADN EN LA ACTIVACIÓN INICIAL DE GENES HEMATOPOIÉTICOS Y MUSCULARES

I consider this work satisfactory and appropriate to be presented as a Ph.D. thesis in the Biochemistry Department of Universidad Autónoma de Madrid.

I hereby issue this certificate, for the purposes required, in London on 18th December, 2003



Joan Boyes, PhD
Team Leader at ICR

Rafael Garesse Alarcón, Doctor en Farmacia y Catedrático del Departamento de Bioquímica de la Universidad Autónoma de Madrid

CERTIFICA: Que Daniela Palacios García, licenciada en Bioquímica por la Universidad Autónoma de Madrid, ha realizado bajo la dirección de la Dra. Joan Boyes (Institute of Cancer Research, Londres) el trabajo titulado:

PAPEL DE LA METILACIÓN DEL ADN EN LA ACTIVACIÓN INICIAL DE GENES HEMATOPOIÉTICOS Y MUSCULARES

Como tutor de tesis considero el trabajo satisfactorio y apto para ser presentado como Tesis Doctoral en el Departamento de Bioquímica de la Universidad Autónoma de Madrid.

Y para que así conste donde proceda, expido el presente certificado en Madrid a 5 de Enero de 2004.



Fdo: Rafael Garesse
Tutor de tesis

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

'Where shall I begin, please your Majesty?' he asked

'Begin at the beginning,' the King said gravely, 'and go on till you come to the end: then stop.'

Lewis Carroll, Alice's Adventures in Wonderland

Pues empecemos por el principio.

En primer lugar me gustaría dar las gracias a la Dra. Joan Boyes por darme la oportunidad de realizar esta tesis en su laboratorio y enseñarme lo que sé acerca del pequeño mundo de la cromatina. También quiero dar las gracias a la Dra. Ana Aranda por ayudarme a dar forma, corregir y adaptar esta versión en español. Pero sobre todo por su apoyo y sus ánimos durante todos estos años y especialmente durante estos últimos meses.

Gracias al 2.1, al de entonces y al que me he encontrado a la vuelta, por todo lo que me ha enseñado. A Ana de nuevo, por acogerme en él cuando decidí adentrarme en el mundo de la ciencia. A Anabel y a Rosa, por la prolactina, las charlas en campana y por ayudarme tanto en mis principios. A Aurora, por sus consejos sobre casi todo y por hacer la vuelta tan fácil. A Susana, por dejar que acudiese siempre a ella en busca de ayuda. A Estela, por su buen humor. A Marinela, por sus clases de salsa y por su curioso punto de vista en las discusiones. A Julián y a Sona, por su ayuda a pesar del poquito tiempo que compartimos. Y no me puedo olvidar de los de ahora: gracias Mariana (creo que la vuelta va a ser divertida), Maxi, Olaia (por tus ánimos), Marina, Ruth, José Miguel, Josune y Mila, por el recibimiento. Parece como si no me hubiese ido nunca.

Gracias a la gente del 2.2.1, especialmente a Ángel Pascual, por tantas pequeñas cosas.

Gracias a los "Crespo" por aparecer un día por Biomédicas. A Imanol por su visión tan clara sobre la vida. A Vicky (¡jo, tía!) porque es genial trabajar con alguien como tú cerca, y mucho mejor tenerte como amiga. A David por haber estado siempre ahí, por ser el primero que vino a verme. Muchas gracias guapo.

Punto y aparte para mis niñas (y Antonio, claro) del 0.3. Mil gracias Bea, por todo lo que me has cuidado durante estos años. Por ser una amiga de verdad. Merche, por demostrarme que no hace falta un mail diario para que las cosas sigan como siempre. Sita, por compartir aficiones (aunque algunas sean tan raras como los ratones de colores). Gracias a Isa y a Toño por hacerme miembro adoptivo del 0.3.

Gracias a Isa, a Tiago, a Monste y a todos aquellos que hacen de Biomédicas algo más que un lugar de trabajo.

Gracias a Marga Fernández por no dejar que los trámites burocráticos pudiesen conmigo. A Mario Vallejo por contestar a mis preguntas sobre desarrollo.

Gracias a Javi, Guti y Nani por ayudarme en mi batalla contra las máquinas, y a Javi (dibujo) por aguantar estoicamente mis pequeños caprichos estéticos.

Pero esta tesis tiene dos partes, y un día aterricé en Londres. Me gustaría dar las gracias a todos aquellos en el ICR que han hecho posible que esté aquí ahora. Este trabajo no hubiese sido posible sin la colaboración del Dr. Dennis Summerbell. Gracias por ser las manos que me

ayudaron con las disecciones. Pero también por la paciencia para enseñarme todo lo que sé sobre embriología.

Gracias a todo mi laboratorio. A Ángel, por recordarme lo que es la ciencia cuando más lo necesitaba, y por todo su apoyo, dentro y fuera del labo. A Matthias, el mejor compañero de poyata (¿o era el único?), por ayudarme a luchar contra tantas y tantas DNasas y/o RNasas, por la perfección técnica, por los "country walks". A Yasmin por estar ahí siempre, y además con una sonrisa (ánimo, tú eres la siguiente). A Remco, Adam, Pampa y Jelená por muchos buenos momentos. Nos vemos en Madrid.

Gracias a Ian y Lyn, por hacer que los días en el FACS fuesen tan divertidos. Por todo lo que me han enseñado. A Jaime Carvajal, por ser mi experto en músculo. Al Dr. Tariq Enver por compartir conmigo sus conocimientos sobre células madre y por ayudarme a recuperar la confianza. A María Vivanco por adoptarme en su laboratorio y prestarme a Ramón. A Ramón por saberlo todo. Muchísimas gracias por tu ayuda. Gracias también a la "Spanish Mafia" por ser siempre una fuente de todo tipo de reactivos. Pero también por los cafés en la sexta planta. Gracias a la gente de GFR.

Gracias a Hakan, a Sammie, a Sharlene, a Eva... por enseñarme que había vida fuera del ICR. A Hakan, por ser el mejor profesor de inglés del mundo.

También quisiera agradecer desde aquí, a todos aquellos que han compartido conmigo estos años, porque sin su apoyo esta tesis hubiese sido mucho más difícil. Gracias a mis amigos de toda la vida (jaupa Torreledones!) porque cada vez que he vuelto es como si nunca me hubiese ido. A Paloma, porque a pesar de la distancia nunca te olvidaste de las mimosas. A los de la Uní, porque en este caso algunos decidieron emigrar conmigo. A Pablo, porque a pesar de todo has estado ahí siempre. A Miguel, por el Principito y los daiquiris de plátano. A Juan, por nuestras cenas, por haberte desplazado a Londres para alguna de ellas.

Gracias sobre todo a mis niños en Londres: Silvia, Sergio y Mario, porque la ciudad de la lluvia eterna no hubiese sido lo mismo sin vosotros. Muchísimas gracias por todo lo que habéis aguantado, especialmente Mario. Si no es por ti, y aquello de "nadar para morir en la orilla" (que poquito me gustó, ¿eh?) quizás las cosas fuesen distintas.

Gracias también a toda mi familia. A mis hermanos, y sobre todo a mi madre, por toda su ayuda y apoyo. Por aguantarme. A mi padre, que siempre está presente. Esta tesis es para vosotros.

RESUMEN

La metilación de citosinas en dinucleótidos CpG es la principal modificación epigenética en mamíferos. El objetivo general de esta tesis fue estudiar el papel que juega esta modificación en la activación inicial de genes durante el desarrollo. Para ello utilizamos como modelo la activación de genes específicos de sangre en células madre hematopoiéticas (HSC) y la expresión de miogenina durante el desarrollo en ratón. Con excepción de las islas CpG, el ADN en células somáticas está altamente metilado. Sin embargo, hasta el momento no se conoce el estado basal desde el cual se activan regiones con una densidad baja de CpGs en células madre. Mediante secuenciación genómica tras el tratamiento con bisulfito sódico hemos demostrado que varias regiones reguladoras de genes hematopoiéticos se activan simultáneamente desde un estado desmetilado en al menos una subpoblación de HSC. Por el contrario, el promotor del gen específico de músculo miogenina se encuentra completamente metilado en casi todos los clones analizados, aunque en un 8% de ellos los tres CpGs alrededor de los sitios de unión de factores de transcripción se encuentran sin modificar. Sin embargo, no hemos detectado expresión de miogenina en HSC. Durante el desarrollo en ratón el promotor de miogenina se encuentra generalmente metilado en somitas posteriores de embriones de e9.5 (que todavía no expresan el gen), y se desmetila en las somitas más anteriores. La desmetilación de los tres CpGs alrededor de los sitios de unión de factores de transcripción es completa en músculo esquelético de ratones neonatos. Dicha desmetilación parece ser previa a la activación del gen, ya que el número de clones sin modificar en somitas anteriores es mayor al número de células que expresan miogenina. El promotor de miogenina es hipersensible a nucleasas en células musculares C2C12 diferenciadas, y no se requiere la unión del factor Myf5 a su sitio en el promotor para la formación de cromatina activa. Sin embargo, Myf5 es necesario para la expresión del gen. Por otro lado, la mutación de los sitios de unión para proteínas de las familias MEF2 y Six reduce notablemente la formación del sitio de hipersensibilidad (HS). La metilación *in vitro* del promotor disminuye fuertemente el número de células capaces de formar un sitio HS, aunque en aquellas que se forma el sitio es completamente activo. En conjunto nuestros resultados apuntan a un papel de la metilación del ADN en restringir la activación inicial de genes hasta el momento adecuado del desarrollo.

SUMMARY

CpG methylation is the major epigenetic modification in mammals. The overall aim of this thesis was to investigate the role of this modification in restricting developmental decisions, using both haematopoietic stem cells (HSC) and myogenin expression during mouse development as models. With the exception of CpG islands, bulk genomic DNA in somatic tissues is heavily methylated. However, the methylation status of low CpG regulatory regions in stem cells had not been studied yet. Bisulfite sequencing of non CpG islands regulatory regions showed that several haematopoietic-specific genes are simultaneously activated from an unmethylated state in at least a subpopulation of bona fide HSC. Conversely, the muscle-specific myogenin promoter was completely methylated in most of the clones, although in 8% of the cells, all three CpG within the factors binding sites were unmethylated. This demethylation did not correlated with myogenin expression in any case. During mouse development myogenin promoter is methylated in e9.5 posterior (non-expressing) somites, but is becoming demethylated in anterior (expressing) somites. In neonatal muscle tissue the promoter is completely unmethylated within these sites. The demethylation seems to be previous to gene activation, as the number of clones fully unmethylated in anterior somites is higher than the number of myogenin expressing cells. Myogenin promoter is nuclease hypersensitive (HS) in differentiated C2C12 muscle cells, and the muscle specific factor Myf5 (necessary for myogenin expression) is not required for chromatin opening. However mutation of Six1 and MEF2 binding sites within the myogenin promoter measurably reduces HS formation. *In vitro* methylation of the promoter strongly decreases the number of cells capable of forming a HS, and increases the number of factors needed to obtain a partially open chromatin structure. Together this data suggest a role for DNA methylation in restricting gene activation until the right developmental moment.

ÍNDICE

ÍNDICE	1
ABREVIATURAS	5
INTRODUCCIÓN	7
1. PATRÓN DE METILACIÓN DEL ADN DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO EN RATÓN	8
2. ADN-METILTRANSFERASAS	10
2.1. DNMT1 (Metiltransferasa de mantenimiento)	11
2.2. DNMT3A Y DNMT3B (Metiltransferasas de novo)	12
3. MECANISMOS DE DESMETILACIÓN	13
3.1. Desmetilación pasiva	13
3.2. Desmetilación activa	14
4. METILACIÓN DE ADN Y REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA	15
5. PAPEL DE LA METILACIÓN DEL ADN EN DIVERSOS PROCESOS BIOLÓGICOS	19
5.1. Silenciamiento de secuencias parásitas	19
5.2. Imprinting genómico	20
5.3. Inactivación del cromosoma X en hembras de mamíferos	21
5.4. Regulación de la expresión de genes específicos de tejido durante el desarrollo embrionario	21
6. METILACIÓN DE ADN, MODIFICACIÓN DE HISTONAS Y COMPLEJOS REMODELADORES DE LA CROMATINA	22
7. CÉLULAS MADRE HEMATOPOIÉTICAS	23
8. MIOGÉNESIS EN EMBRIONES DE RATÓN	25
OBJETIVOS	28
MATERIALES Y MÉTODOS	29
I. MATERIALES	29
1. LÍNEAS CELULARES	29
1.1. Células MEL	29
1.2. Proeritroblastos (precursores hematopoiéticos)	29
1.3. Células C2C12	29
1.4. Células CV-1	30

2. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	30
3. PLÁSMIDOS	30
3.1 Plásmidos reporteros	30
3.2. Vectores de expresión	32
3.3 Vectores "vacíos"	32
3.4. Sondas	33
4. ANTICUERPOS	33
II. MÉTODOS	34
1. AISLAMIENTO DE CÉLULAS HEMATOPOIÉTICAS	34
1.1. Aislamiento de células madre hematopoiéticas: lin-, c-kit+, Sca-1+	34
1.2. Aislamiento de células B y T: B220+ y CD3+	35
2. DISECCIÓN DE TEJIDOS MUSCULARES	35
2.1. <i>Disección de somitas en embriones de día 9.5</i>	35
2.2. Disección de músculo esquelético en ratones neonatos	36
3. EXTRACCIÓN DE ADN Y ANALISIS POR BISULFITO DEL ESTADO DE METILACIÓN	36
3.1. Extracción de ADN genómico	36
3.2. Desnaturalización y tratamiento	36
3.3. Eliminación del exceso de sales y desulfonación	37
3.4. <i>Amplificación por PCR, clonaje y secuenciación</i>	37
3.5. Análisis por bisulfito de fragmentos de ADN plasmídico	38
3.6. Análisis por bisulfito de ADN genómico procedente de células transfectadas establemente	38
3.7. Análisis por bisulfito de ADN plasmídico procedente de células transfectadas transitoriamente	38
4. MUTAGÉNESIS DIRIGIDA	39
5. METILACIÓN <i>in vitro</i> DEL ADN	40
6. ENSAYOS DE EXPRESIÓN TRANSITORIA	40
6.1. Transfecciones	40
6.2. Medida de la actividad β -galactosidasa	41
6.3. Medida de la actividad luciferasa	41
7. ENSAYO DE RETARDO DE LA MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA EN GEL (EMSA)	41
7.1. Preparación de extractos nucleares (protocolo adaptado de Andrews and Faller, 1991)	42
7.2. Marcaje de la sonda	42
7.3. Incubación de los extractos nucleares con la sonda radiactiva	43
7.4. Electroforesis	43
8. EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS DE ARN	43
8.1. Extracción de ARN	43
8.2. RT-PCR múltiple	43

8.3. RT-PCR múltiple en células individuales	45
9. GENERACIÓN DE LÍNEAS ESTABLES	45
10. MAPEO CON DNasa I y ENSAYOS DE ACCESIBILIDAD A ENZIMAS DE RESTRICCIÓN	46
10.1. Extracción de núcleos	46
10.2. Digestión de núcleos con DNasa I	46
10.3. Digestión de núcleos con enzimas de restricción	46
10.4. Southern blot e hibridación de las membranas	47
RESULTADOS	48
1. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS MADRE HEMATOPOIÉTICAS	48
2. LAS REGIONES REGULADORAS DE GENES HEMATOPOIÉTICOS SE ACTIVAN DESDE UN ESTADO NO METILADO EN CÉLULAS lin-, c-kit+, Sca-1+	51
2.1. <i>Enhancer</i> intrónico de IgH	51
2.2. <i>Enhancer</i> de la mieloperoxidasa (MPO)	54
2.3. El promotor del receptor de eritropoietina (EpoR)	55
3. EL PROMOTOR DE MIOGENINA ESTÁ DESMETILADO EN UN 8 % DE LAS CÉLULAS MADRE HEMATOPOIÉTICAS	57
4. LAS CÉLULAS MADRE HEMATOPOIÉTICAS NO EXPRESAN GENES MUSCULARES	59
5. DESMETILACIÓN DEL PROMOTOR DE MIOGENINA EN SOMITAS DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO	59
6. PROTEÍNAS DE LA FAMILIA bHLH SE UNEN A LA CAJA E PROXIMAL DEL PROMOTOR DE MIOGENINA INDEPENDIENTEMENTE DEL ESTADO DE METILACIÓN DEL CpG ADYACENTE	63
7. LAS SOMITAS POSTERIORES DE EMBRIONES DE e9.5 NO EXPRESAN MIOGENINA A PESAR DE TENER LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN NECESARIOS	65
8. EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE MYF5, MEF2A Y SIX 1 EN SOMITAS ANTERIORES Y POSTERIORES DE EMBRIONES DE e9.5	65
9. MYF5, MEF2A Y SIX 1 NO SON CAPACES DE ACTIVAR EL PROMOTOR DE MIOGENINA METILADO EN ENSAYOS DE TRANSFECCIONES TRANSITORIAS	68
10. NUEVA APROXIMACIÓN: ENSAYOS DE ACCESIBILIDAD AL PROMOTOR DE MIOGENINA EN CÉLULAS C2C12 TRANSFECTADAS ESTABLEMENTE	71
11. EL PROMOTOR DE MIOGENINA ES SENSIBLE A DNasa I Y ACCESIBLE A ENZIMAS DE RESTRICCIÓN EN CÉLULAS C2C12 DIFERENCIADAS	73
12. LA METILACIÓN DEL PROMOTOR DE MIOGENINA DISMINUYE LA PROBABILIDAD DE FORMACIÓN DEL SITIO DE HIPERSENSIBILIDAD HS1	77
13. LA METILACIÓN DEL PROMOTOR DISMINUYE EL NÚMERO DE CÉLULAS CAPACES DE FORMAR UN SITIO DE HIPERSENSIBILIDAD	80

14. LAS CÉLULAS C2C12 NO SON CAPACES DE DESMETILAR EL PROMOTOR DE MIOGENINA METILADO IN VITRO EN RESPUESTA A ESTÍMULOS DE DIFERENCIACIÓN	82
DISCUSIÓN	86
1. METILACIÓN DEL ADN Y DESARROLLO EN VERTEBRADOS	86
2. DESMETILACIÓN DE SECUENCIAS REGULADORAS Y ACTIVACIÓN GÉNICA	87
2.1. Células madre hematopoiéticas: potencial de diferenciación y plasticidad celular	87
2.2. Las células madre lin-, c-kit+, Sca-1+ coexpresan genes de varios linajes hematopoiéticos	88
2.3. Las regiones reguladoras de genes hematopoiéticos se activan desde un estado no metilado en células madre	88
2.4. El promotor de miogenina se encuentra desmetilado en una subpoblación de células lin-, c-kit+, Sca-1+	90
2.5. Desmetilación de miogenina durante el proceso de miogénesis en ratones	91
3. PAPEL DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN Y LA METILACIÓN DEL ADN EN LA GENERACIÓN DE CROMATINA ACTIVA	92
3.1. La expresión de miogenina depende de factores bHLH específicos de músculo y de proteínas de las familias MEF2 y Six	92
3.2. La metilación del promotor de miogenina inhibe su activación transcripcional en ensayos de transfecciones transitorias	94
3.3. El promotor de miogenina se encuentra en una conformación accesible a nucleasas en miotubos C2C12	95
3.4. Influencia de los factores bHLH específicos de músculo y de proteínas MEF2 y Six en la formación del sitio HS1 del promotor de miogenina	96
3.5. La metilación del promotor de miogenina disminuye el número de células capaces de formar un HS	98
3.6. Ausencia de desmetilación del promotor de miogenina metilado in vitro durante la diferenciación de células C2C12	100
4. CONCLUSIONES FINALES Y PERSPECTIVAS FUTURAS	101
CONCLUSIONES	103
BIBLIOGRAFÍA	105

ABREVIATURAS

5me-C: 5 metil-citosina.

ADNc: ADN codificante.

ATRX: Proteína responsable del síndrome de retraso mental y α -talasemia asociados al cromosoma X.

β gal: β -galactosidasa.

bHLH: Dominio de unión a ADN tipo hélice-lazo-hélice básico.

CAF-1: Factor de ensamblaje de cromatina 1.

CARM1: Metiltransferasa de argininas asociada a coactivadores-1.

CBP: Proteína de unión a CREB.

Ci: Curios.

DDM1: Deficiente en metilación de ADN.

DMAPI: Proteína asociada a DNMT1-1

DMEM: Medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco.

DNMT: Metiltransferasa de ADN.

e: día del desarrollo embrionario (día post coito).

Epo: Eritropoietina.

EpoR: Receptor de eritropoietina.

ER: Receptor de estrógenos.

ES: Células madre embrionarias.

FACS: Separador celular activado por fluorescencia.

FITC: Isotiocianato de fluoresceína.

GR: Receptor de glucocorticoides.

GRIP-1: Proteína que interacciona con el receptor de glucocorticoides-1.

HDAC: Deacetilasa de histonas.

Hepes: N-[2-hidroxietil]piperazina-N'-[ácido 2-etanosulfónico]

HTF: Pequeños fragmentos HpaII.

HPRT: Hidroxifosforibosil transferasa.

HS: Sitio de hipersensibilidad a DNasas.

HSC: Células madre hematopoiéticas.

IAP: Partícula intercisternal A.

ICF: Síndrome que cursa con inmunodeficiencia, inestabilidad centromérica y anomalías faciales.

IgH: Cadena pesada de las inmunoglobulinas.

IL: Interleukina.

- lin:** Linaje.
- Lsh:** helicasa específica de linfocitos.
- Luc:** luciferasa.
- M:** Molar.
- MADS:** (*MCM1, Agamous, Deficienss, Serum Response factor*).
- MBD:** Dominio de unión a ADN metilado.
- MeCP1 y 2:** Proteínas de unión a CpG metilados 1 y 2.
- MEF2:** Factor activador de miocitos 2.
- MPO:** Mieloperoxidasa.
- MPP:** Progenitor multipotente.
- MRF:** Factor regulador de músculo.
- NP-40:** Nonidet P-40.
- pb:** Pares de bases.
- ONPG:** O-nitrofenil- β -D-galactopiranosido.
- PBS:** Tampón fosfato salino pH 7.5.
- PE:** Ficoeritrina.
- PK:** Proteinasa K
- PHD:** Homeodominio de plantas.
- PMSF:** fenil-metil-sulfonil-fluoruro.
- pRb:** Proteína del retinoblastoma.
- rpm:** Revoluciones por minuto.
- SAM:** S-adenosil-L-metionina.
- SC:** Suero de caballo.
- SFT:** Suero fetal de ternera.
- TBE:** Tampón tris-borato-EDTA.
- TE:** Tris-EDTA.
- TRD:** Dominio de represión transcripcional.
- Tris:** Tris(hidroximetil)aminometano.
- U:** Unidades.
- URL:** Unidades relativas de actividad luciferasa.
- X-gal:** 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactósido.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

El interior de una célula eucariota en un organismo pluricelular contiene toda la información necesaria para el correcto desarrollo de dicho organismo. Esta información está codificada en la secuencia lineal de casi dos metros de largo que constituye el ADN, el cual se encuentra empaquetado con histonas y otras proteínas formando una estructura denominada cromatina. Sin embargo, una célula típica humana sólo expresa unos pocos de los más de 30000 genes que contiene, y tan importante es para el correcto funcionamiento de la célula decidir qué genes se van a expresar, como mantener el resto en un estado inactivo. Todo esto se consigue mediante la activación de distintas rutas de señalización, que dan lugar a la expresión diferencial de genes en cada tejido. Al mismo tiempo, la célula tiene que ser capaz de “recordar” este patrón de expresión génica y de transmitírselo a sus células hijas.

Puesto que la secuencia genómica es la misma en todas las células de un organismo pluricelular (exceptuando las células productoras de anticuerpos y los linfocitos T en mamíferos), es muy probable que los distintos patrones de expresión génica en células diferenciadas estén modulados por modificaciones epigenéticas. Éstas se definen como cambios en la función génica que son heredables por mitosis y/o meiosis y que no se pueden explicar en términos de cambios en la secuencia de ADN (Russo et al., 1996).

La forma más común de modificación epigenética en mamíferos es la unión covalente de un grupo metilo al carbono 5 del anillo de citosina en dinucleótidos CpG. Para poder comprender bien el papel que juega esta modificación en vertebrados es necesario explicar alguna de las características de dicho dinucleótido. La primera de ellas es su rareza. La frecuencia de CpGs en vertebrados es sólo 1/5 de la esperada según la composición de bases, y esta baja frecuencia es una consecuencia directa de la segunda característica del dinucleótido, la metilación en posición 5 de las citosinas. En mamíferos, entre el 60 y 80% de todos los CpG se encuentran metilados, de tal forma que se pueden distinguir dos fracciones en el genoma: la primera de ellas, con una densidad baja de CpGs, comprende el 98-99% del genoma. En ella, las citosinas del dinucleótido CpG están siempre metiladas. La segunda fracción la constituye el 1-2% restante del genoma, donde la frecuencia de CpGs es alta y además se encuentran libres de metilación en todos los tejidos del organismo, con excepción de aquellas asociadas a

promotores del cromosoma X inactivo, o a secuencias reguladoras de genes que se inactivan por *imprinting*. Estas secuencias fueron detectadas inicialmente en el genoma de varios vertebrados como fragmentos de ADN capaces de ser digeridos por la enzima de restricción sensible a metilación HpaII, y se denominaron islas HTF (*HpaII tiny fragments*) o islas CpGs (Cooper et al., 1983). Las islas CpGs están asociadas a las regiones 5' del 50% de los genes en vertebrados, incluyendo todos los genes constitutivos analizados y el 40% de los genes específicos de tejido (Antequera and Bird, 1993; Larsen et al., 1992).

Como se menciona anteriormente, parece que la baja densidad de CpGs en el resto genoma es una consecuencia de la propia metilación de las citosinas. Este nucleótido tiene una elevada tendencia a la deaminación y por tanto una frecuencia de mutación mayor que el resto de las bases del ADN. Si la citosina se encuentra desmetilada, el producto de deaminación es uracilo, el cual es reconocido y eliminado por la maquinaria de reparación de la célula. Sin embargo, la deaminación de citosinas metiladas da lugar a timidina, generando apareamientos T/G en el ADN. En estos casos, las células también son capaces de corregir el apareamiento erróneo, y en el 90% de los casos se reestablece la secuencia original CpG. Sin embargo, en un 8% de los casos, la célula corrige el apareamiento en favor de la timidina, dando lugar a dinucleótidos TpG o CpA (Brown and Jiricny, 1987). Por tanto, en un sentido estricto, las islas CpG no son secuencias ricas en CpGs, sino que tienen una densidad de este dinucleótidos acorde con la composición de bases del ADN, mientras que es el resto del genoma el que contiene una frecuencia anómalamente baja del dinucleótido.

1. PATRÓN DE METILACIÓN DEL ADN DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO EN RATÓN

Como hemos visto, el genoma en mamíferos adultos está generalmente metilado en la fracción del ADN con una densidad baja de CpGs, mientras que permanece desmetilado en las secuencias ricas en este dinucleótido. Aunque no está del todo claro como se alcanza este patrón final de metilación, sabemos que los niveles de metilación del organismo varían durante el desarrollo embrionario. Utilizando un ensayo semicuantitativo, (Monk et al., 1987) fueron los primeros en observar un proceso de desmetilación global en embriones entre los estadios de 8 células y blastocisto, previo a la implantación del embrión. Observaron también que las células primordiales de la

línea germinal (PGC) y los oocitos maduros contienen niveles relativamente bajos de metilación. Este primer indicio de la existencia de diferentes patrones de metilación en células germinales masculinas y femeninas viene apoyado por los trabajos de Sanford y cols. (Sanford et al., 1987) y Kafri y cols. (Kafri et al., 1992). En ellos se observó que varias secuencias están hipometiladas en oocitos e hipermetiladas en espermatozoides.

Las diferencias en el patrón de metilación de los genomas parentales se eliminan durante los primeros estadios del desarrollo embrionario, de tal forma que se pierde el patrón de metilación heredado, y en el estadio de 16 células (mórula) se alcanza el nivel mínimo de metilación del embrión (Kafri et al., 1992).

Sin embargo, la cinética con la que ambos genomas alcanzan este nivel mínimo de metilación es distinta. Así, el genoma paterno sufre un proceso de desmetilación muy rápido, en las 4-6 horas siguientes a la fertilización y previo a la primera ronda de replicación del ADN, lo que sugiere la existencia de un mecanismo activo de desmetilación. Mientras tanto, el genoma materno permanece metilado tras la fertilización o incluso sufre metilación *de novo*. La selectividad de este proceso puede venir explicada por el descubrimiento de que durante las primeras etapas de la embriogénesis el genoma materno y el paterno se localizan en compartimentos distintos del núcleo celular (Mayer et al., 2000a; Mayer et al., 2000b; Oswald et al., 2000).

A continuación, el embrión sufre un proceso de desmetilación pasiva que afecta por igual a los dos genomas (Rouquier et al., 1998), de tal forma que en cada ronda de replicación del ADN el patrón de metilación de la hebra madre no se copia a la hebra hija. Esto continúa hasta el estadio de blastocisto (día 3.5 del desarrollo embrionario, e3.5) en el que los niveles de metilación alcanzan un mínimo. Sin embargo la desmetilación no es completa y los genes regulados por *imprinting* escapan a este proceso. Una vez que el embrión se implanta en el útero comienza un proceso de metilación *de novo*, que dará lugar al patrón de metilación definitivo del organismo adulto. Este proceso se inicia en las células de la masa interna del blastocisto, y los niveles de metilación aumentan rápidamente en el ectodermo primitivo que dará lugar al embrión propiamente dicho. Mientras tanto, las células del trofoblasto y del endodermo primitivo (que dan lugar a la placenta y al saco de Yolk, respectivamente) permanecen libres de metilación (Chapman et al., 1984; Rossant et al., 1986; Santos et al., 2002). La metilación es prácticamente completa en embriones de e6.5 y sólo las islas CpG (excepto aquellas asociadas al cromosoma X inactivo o a secuencias reguladoras de genes que se inactivan por *imprinting*) escapan a esta ola de metilación *de novo* (Kafri

et al., 1992). Es en estadios posteriores del desarrollo embrionario cuando muchos genes específicos de tejido con una densidad baja en CpGs sufren desmetilación selectiva en aquellas células donde se activa el gen (revisado en Bergman and Mostoslavsky, 1998; Mostoslavsky and Bergman, 1997).

2. ADN-METILTRANSFERASAS

La transferencia de un grupo metilo procedente de la S-adenosil-L-metionina (SAM) al carbono 5 del anillo aromático de citosinas viene catalizado por al menos tres ADN-metiltransferasas (DNMTs) independientes: DNMT1, DNMT3A y DNMT3B. La reacción, químicamente improbable en solución acuosa, transcurre mediante un mecanismo bastante inusual, en el que la citosina que va a ser modificada sobresale de la doble hélice del ADN para introducirse en el sitio activo de la enzima. Una vez ahí, es activada en el carbono 6 del anillo, lo que provoca la formación de un carbanión en el carbono 5, que ahora puede atacar el grupo metilo del sustrato (SAM) (Klimasauskas et al., 1994; Santi et al., 1983).

En la figura 1 se muestra la estructura de las DNMTs descritas hasta el momento.

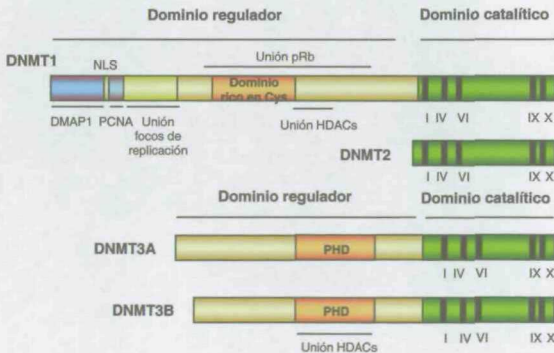


Fig. 1. Estructura de las ADN metiltransferasas DNMT1, DNMT3A y DNMT3B en mamíferos. La región C-terminal (verde) representa el dominio catalítico y se han señalado en negro los motivos conservados implicados en la actividad catalítica. DMAP1 y PCNA en DNMT1 indican las regiones de unión a estas proteínas, y NLS la señal de localización nuclear. Se indica también la región que dirige a la proteína a focos de replicación y las zonas de interacción con HDACs y pRb. En la región

media de la proteína existe un dominio rico en cisteínas similar al observado en la proteína de unión a ADN metilado MBD1, pero distinto al dominio PHD de DNMT3A y DNMT3B.

2.1. DNMT1 (Metiltransferasa de mantenimiento)

Clonada hace 15 años (Bestor et al., 1988), es la más abundante en células somáticas. Esta enzima, de 1620 aminoácidos, tiene entre 10 y 40 veces más afinidad por ADN hemimetilado que por ADN sin metilar (Pradhan et al., 1999) y se localiza preferentemente en focos de replicación durante la fase S del ciclo celular (Leonhardt et al., 1992; Liu et al., 1998). Además su expresión está bajo el control del ciclo, siendo alta en condiciones de proliferación y baja en células postmitóticas (Robertson et al., 2000b; Szyf et al., 1991). Por todo esto se le considera la metiltransferasa de mantenimiento, encargada de copiar el patrón de metilación de la hebra madre en la cadena de ADN recién sintetizada. Como se ve en la figura 1, esta enzima está constituida por dos dominios principales: el extremo carboxi-terminal, que constituye el dominio catalítico de la enzima y está conservado en el resto de las metiltransferasas, y el extremo amino-terminal. Este último, de unos 1000 aminoácidos, contiene una señal de localización nuclear, una secuencia que lo dirige hacia focos de replicación, y un dominio de unión a Zn rico en cisteínas (CXXC). Recientemente se ha descrito que DNMT1 puede reprimir la transcripción a través de su extremo N-terminal, en una función independiente de la actividad metiltransferasa, y debida en parte a su interacción con proteínas deacetilasas de histonas (HDAC 1 y 2), así como con la proteína del retinoblastoma (pRb), o el correpresor DMAP1 (*DNMT1 Associated Protein 1*) (Fuks et al., 2000; Robertson et al., 2000a; Rountree et al., 2000).

Los ratones homocigotos deficientes en DNMT1 mueren antes de nacer, y los embriones contienen entre un 10 y un 30% de los niveles normales de 5 metil-citosina (5me-C) (Lei et al., 1996; Li et al., 1992), indicando que esta proteína es necesaria para un correcto desarrollo embrionario. Sorprendentemente, las células madre embrionarias (ES) homocigotas para esta mutación son viables y contienen niveles bajos pero estables de 5me-C, lo que sugirió por primera vez la existencia de otras metiltransferasas. En embriones de *Xenopus*, la pérdida de xDNMT1 induce apoptosis mediada por p53.

Existen varias isoformas de DNMT1 en mamíferos, que surgen como resultado de la utilización de promotores distintos o mediante procesamiento alternativo de los mensajeros. DNMT1s se expresa en células somáticas a partir de un promotor

constitutivo (Mertineit et al., 1998; Yoder et al., 1997a). En humanos existe un producto de procesamiento alternativo denominado DNMT1b que también se expresa en células somáticas. (Bonfils et al., 2000; Hsu et al., 1999). DNMT1o es una isoforma sintetizada a partir de un promotor alternativo, que carece de los primeros 118 aminoácidos y que sólo se expresa en oocitos y durante el periodo de preimplantación en embriones. Ratones deficientes en esta isoforma indican que DNMT1o funciona como metiltransferasa de mantenimiento exclusivamente en el estadio embrionario de 8 células (Howell et al., 2001; Mertineit et al., 1998). Existe también un promotor específico de testículo denominado 1p, que da lugar a un único transcrito en espermatocitos (Mertineit et al., 1998), y se ha descubierto además, una isoforma en músculo cuyo análisis de secuencia indica que es idéntica a la de testículo (Aguirre-Arteta et al., 2000).

2.2. DNMT3A Y DNMT3B (Metiltransferasas *de novo*)

Basándose en homologías de secuencia, en 1998 se identificaron tres nuevas proteínas que podían contener dominios metiltransferasa. La primera de ellas se denominó DNMT2, y presenta una alta homología con el gen *pmt1p* de *Schizosaccharomyces pombe* (Yoder and Bestor, 1998). Sin embargo, la disrupción de DNMT2 en células ES de ratón no tuvo ningún efecto en los niveles de metilación de estas células ni en su capacidad de metilar *de novo* ADN retroviral (Okano et al., 1998b). Hasta el momento no se conoce su función, pero se sabe que está conservada en otros organismos de la escala filogenética, aunque no en todos. Recientemente sin embargo, se ha observado que también DNMT2, al igual que el resto de las metiltransferasas, es capaz de asociarse con ADN genómico conteniendo 5-aza-2'-deoxicitidina, lo que sugeriría que la enzima puede ser activa *in vivo* (Liu et al., 2003). Un poco más tarde Okano y cols. (Okano et al., 1998a) clonaron y caracterizaron una nueva familia de metiltransferasas compuesta por dos genes **DNMT3A** y **DNMT3B**. Estas enzimas se expresan en grandes cantidades en células ES sin diferenciar, mientras que los niveles son bajos en células somáticas de adultos. Ambas son necesarias para el correcto desarrollo de ratones, y son las responsables de la ola de metilación *de novo* que ocurre durante el desarrollo embrionario en mamíferos, así como de la metilación de secuencias retrovirales en células ES (Okano et al., 1999). A pesar de pertenecer a la misma familia, DNMT3A y DNMT3B tienen funciones no solapantes y se ha descrito que mientras que DNMT3B es necesaria para la metilación de las repeticiones

centroméricas menores, DNMT3A no juega ningún papel en este proceso. Del mismo modo, aunque ambas son necesarias para un correcto desarrollo, los ratones homocigotos *dnmt3a*^{-/-} llegan a nacer (aunque mueren a las cuatro semanas de edad), mientras que la delección *dnmt3b*^{-/-} causa letalidad durante el desarrollo embrionario. Sin embargo, el fenotipo del doble mutante es más grave, lo que sugiere que al menos algunas de sus funciones sí son comunes.

Además del dominio catalítico característico de las metiltransferasas, DNMT3A y DNMT3B contienen un extremo amino-terminal con baja homología de secuencia entre ellas, con excepción de un dominio rico en cisteínas. Este dominio es diferente al que se encuentra en DNMT1, aunque es homólogo al homeodominio similar al de plantas (PHD) presente en muchas proteínas asociadas a cromatina. A través de este dominio DNMT3A interacciona con HDAC1 y es capaz de reprimir transcripción de forma independiente de su actividad metiltransferasa (Fuks et al., 2001). En humanos la mutación de DNMT3B está asociada con el síndrome ICF (*Immunodeficiency, Centromeric instability, Facial anomalies*), una enfermedad autosómica recesiva que se caracteriza por tener hipometiladas las secuencias de los satélites II y III, principales componentes de la heterocromatina en los centrómeros (Okano et al., 1998a).

3. MECANISMOS DE DESMETILACIÓN

A pesar de que existen numerosos datos acerca de los mecanismos y enzimas que controlan la metilación del ADN, las bases moleculares que controlan el proceso contrario de desmetilación no se conocen bien. Hasta el momento se han propuesto dos mecanismos generales cuyo resultado final es la sustitución de 5me-citosina por citosina en la cadena de ADN.

3.1. Desmetilación pasiva

Durante el proceso de replicación del ADN, la metiltransferasa de mantenimiento DNMT1 es la encargada de copiar el patrón de metilación de la hebra madre en las cadenas recién sintetizadas. Sin embargo, la estructura de la cromatina y los complejos asociados con actividad transcripcional pueden interferir con la actividad de DNMT1, dando lugar a una desmetilación progresiva de nucleótidos CpG en cada ciclo de replicación (revisado en Wolffe et al., 1999). Es posible además que la unión de factores de transcripción a sus secuencias específicas en el ADN impida el acceso de

DNMT1 de forma dependiente de secuencia. De acuerdo con esta hipótesis, se ha descrito que la presencia de los factores de transcripción adecuados en embriones de *Xenopus* conducen a una desmetilación pasiva y dependiente de replicación de promotores metilados *in vitro* (Matsuo et al., 1998). Del mismo modo, se ha visto que los sitios de unión de proteínas como el antígeno de unión nuclear (EBNA1) del virus de Epstein-Barr en su origen de replicación (Hsieh, 1999) o del represor lacI de *Escherichia coli* en el operón lac (lacO) (Lin et al., 2000), dan lugar a un proceso de desmetilación en episomas estables. En el caso del operón lacO este fenómeno se ha observado también en ADN establemente integrado en cromosomas (Han et al., 2001). En todos estos casos, la desmetilación de la primera hebra de ADN tiene lugar mediante un proceso pasivo dependiente de replicación, seguido por una desmetilación activa de la segunda hebra.

3.2. Desmetilación activa

A pesar de que eliminar un grupo metilo de citosinas es un proceso energéticamente desfavorable, que conlleva la ruptura de un enlace C-C o la sustitución de la base modificada o el nucleótido entero en la cadena de ADN, existen ejemplos durante el desarrollo que no pueden ser explicados por un mecanismo de desmetilación pasiva dependiente de replicación. Entre ellos destaca el fenómeno de desmetilación global que sufre el genoma paterno durante las 4-6 primeras horas tras la fertilización descrito anteriormente. Además se han descrito varios genes específicos de tejido capaces de desmetilar sus secuencias reguladoras en las células que expresan el gen, en ensayos que no permiten la replicación del ADN. Éste es el caso de la desmetilación del gen de α -actina en mioblastos L8 de rata (Paroush et al., 1990), del gen de δ -cristalino en células postmitóticas de la lente (Sullivan and Grainger, 1987), del gen de vitelogenina de pollo (Saluz et al., 1986) o del *enhancer* del gen de interleukina 2 en linfocitos T (Bruniquel and Schwartz, 2003).

Muchos han sido los esfuerzos por caracterizar la actividad o actividades enzimáticas responsables de este proceso. Por una parte, se ha descrito un mecanismo de desmetilación activa en extractos celulares de mioblastos de rata, mediante el cual el nucleótido entero 5me-C se transfiere a una molécula ARN (Weiss et al., 1996). Un estudio posterior sin embargo, demostró que la actividad desmetilasa de estos extractos no es sensible a RNasas como se pensaba inicialmente y sí es sensible a proteasas (Swisher et al., 1998).

Otro posible mecanismo para conseguir sustituir 5me-citosina por citosina en la cadena de ADN es mediante la acción de una glicosilasa 5-metilcitosina que remueva la base metilada del ADN dejando la deoxirribosa intacta. A continuación la maquinaria de reparación de la célula añadiría de nuevo la citosina en forma de nucleótido (Jost and Jost, 1995; Jost et al., 1995). Esta reacción parece estar dirigida por un complejo que contiene ARN, al menos en embriones de pollo (Jost et al., 1997). La búsqueda de proteínas con actividad glicosilasa 5-metilcitosina implicó en este proceso a dos proteínas previamente conocidas. La primera de ellas es TDG, la glicosilasa encargada de remover la base de pirimidina en apareamientos erróneos T/G o U/T (Zhu et al., 2000b). La segunda, MBD4, es una proteína con dominio de unión a ADN metilado, con capacidad también de reparar apareamientos T/G (Zhu et al., 2000a).

Termodinámicamente, la forma más improbable de obtener ADN desmetilado es mediante ruptura directa del enlace C-C entre el grupo metilo y el C5 del anillo de citosinas. En 1999 se purificó una fracción a partir de células humanas que cataliza la reacción de hidrólisis de este grupo metilo, dando lugar a la base sin modificar y metanol (Ramchandani et al., 1999). Ese mismo año se identificó a la proteína responsable de dicha actividad como MBD2b, una isoforma de la proteína de unión a ADN metilado MBD2 que hasta el momento se había relacionado con represión de secuencias metiladas (Bhattacharya et al., 1999). Sin embargo, los intentos posteriores de reproducir este resultado en otros laboratorios no han tenido éxito (Ng et al., 1999; Wade et al., 1999).

Como vemos, a pesar de que han pasado casi 20 años desde los primeros experimentos que sugerían la existencia de un mecanismo activo de desmetilación del ADN, las bases moleculares de este mecanismo permanecen todavía sin identificar claramente.

4. METILACIÓN DE ADN Y REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

Hasta ahora nos hemos centrado en el estudio de los mecanismos que dan lugar al patrón final de metilación durante el desarrollo. Sin embargo, para poder comprender el papel que juega en la regulación de distintos procesos biológicos es necesario explicar como las células interpretan esta modificación epigenética.

Existen dos mecanismos mediante los cuales la metilación del ADN puede afectar a la expresión de genes. Por un lado se sabe que esta modificación es capaz de inhibir directamente la unión de componentes de la maquinaria basal de transcripción o de algunos factores de transcripción al ADN (Comb and Goodman, 1990; Kass et al., 1997a; Kass et al., 1997b; Maier et al., 2003; Weih et al., 1991). Sin embargo, éste no es un mecanismo general, ya que no todos los factores tienen sitios CpG en sus secuencias de reconocimiento, y no todos los que los tienen ven afectada su unión cuando la citosina está metilada (Holler et al., 1988). Además sería difícil pensar que la célula ha desarrollado un mecanismo de metilación global que afecta a la mayoría de los CpG si sólo fuese necesario modificar aquellos asociados a los sitios de unión de factores de transcripción.

Por otra parte, evidencias acumuladas a lo largo de los últimos 12 años indican que la señal de metilación viene interpretada por proteínas que reconocen selectivamente dinucleótidos CpG metilados. La unión de estas proteínas es capaz de reclutar complejos con actividad deacetilasa de histonas al ADN metilado, lo que conduce a una compactación de la cromatina y al silenciamiento de las secuencias asociadas. Hasta el momento se han descrito cinco proteínas con un dominio de unión a CpGs metilados: MeCP2, MBD1, MBD2, MBD3 y MBD4, y una sexta, Kaiso, que a pesar de carecer de este motivo es capaz de unirse a al menos dos CpGs simétricamente metilados. Todas ellas están representadas en la figura 2.

La primera de estas actividades, descrita en 1989, se denominó **MeCP1** (*Methyl CpG Binding Protein 1*) y es en realidad un complejo multiproteico de unos 400-800 kDa (Meehan et al., 1989). MeCP1 se une a ADN metilado simétricamente en al menos 12 CpGs y es capaz de inactivar genes asociados a islas CpGs *in vitro* e *in vivo* (Boyes and Bird, 1991). **MeCP2**, por el contrario, consiste en un único polipéptido capaz de unirse selectivamente a un dinucleótido CpG metilado simétricamente, de forma independiente de secuencia (Lewis et al., 1992; Nan et al., 1997). MeCP2 es muy abundante y se localiza en cromosomas en regiones ricas en ADN metilado (Nan et al., 1998). La proteína contiene dos dominios principales. El dominio de unión a ADN metilado o MBD (*Methyl CpG Binding Domain*) está situado en la región amino-terminal de la proteína y es necesario y suficiente para dirigir a la proteína hacia los nucleótidos metilados (Nan et al., 1993; Nan et al., 1996). Es también a través de este dominio por donde se une a CpG en el contexto de nucleosomas (Chandler et al., 1999). En la región media de la proteína encontramos un dominio de represión transcripcional

(TRD), necesario para la represión de la transcripción tanto *in vivo* como *in vitro*. A través de este dominio MeCP2 se asocia con HDAC, con el complejo Sin3 y con metiltransferasas de la histona H3 (Fuks et al., 2003a; Fuks et al., 2003b; Jones et al., 1998; Nan et al., 1998). MeCP2 es esencial para el desarrollo embrionario en ratón (Tate et al., 1996), y mutaciones en este gen en humanos están asociadas al síndrome de Rett. Ésta es una enfermedad neurológica ligada al cromosoma X que afecta a una entre 10000-22000 niñas al nacer (revisado en (Kriaucionis and Bird, 2003) y que se caracteriza por dar lugar a un desarrollo normal durante el primer año, seguido por una regresión severa de las capacidades adquiridas.

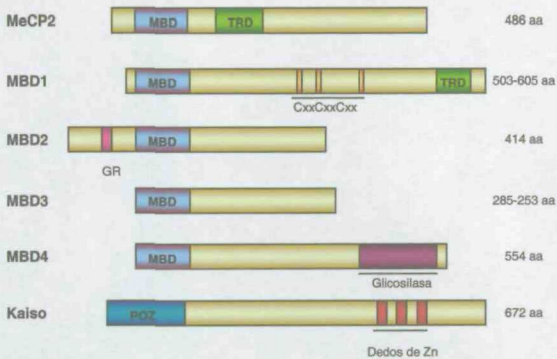


Fig. 2. Estructura de las proteínas de unión a ADN metilado identificadas en mamíferos. La región en azul indica el dominio MBD conservado en las proteínas MeCP2 y MBD1-4. TRD representa el dominio de represión transcripcional encontrado en MBD1 y MeCP2, y CxxCxxCxx la región rica en cisteínas de MBD1 similar a la que se encuentra en DNMT1. GR representa repeticiones de glicina-arginina y en morado se señala el dominio de MBD4 con actividad glicosilasa y responsable de reparar apareamientos erróneos T/G. Kaiso no pertenece a la familia MBD y se une a ADN por la región de dedos de Zn. Tiene además un dominio POZ implicado en represión transcripcional.

Búsquedas con el dominio de unión a ADN (MBD) de MeCP2 en las bases de EST condujeron a la identificación de cuatro proteínas que contenían esta secuencia y que se denominaron MBD1-4. Todas ellas son más o menos ubicuas, con la excepción de que las células madre embrionarias (ES) no expresan MBD1 y sólo expresan bajos niveles de MBD2 (Hendrich and Bird, 1998). Por otro lado, exceptuando el dominio

homólogo de unión a ADN metilado estas proteínas no tienen apenas homología de secuencia, aunque algunas de sus funciones son comunes.

La primera en clonarse fue **MBD1** (denominada originalmente PCM1) e inicialmente se pensó que era parte del complejo MeCP1 en mamíferos (Cross et al., 1997). Actualmente se sabe que no forma parte de él, ya que su masa molecular no coincide con la de los componentes del complejo (Ng et al., 2000). MBD1 reprime transcripción desde ADN tanto metilado como no metilado y se asocia con complejos con actividad metilasa de la histona H3 (Suv39h1-HP1) (Fujita et al., 2003) y con CAF-1 (*Chromatin Assembly Factor*) (Reese et al., 2003). Ratones homocigotos deficientes en esta proteína tienen fallos en neurogénesis y en la función del hipocampo (Zhao et al., 2003).

MBD2 y MBD3 son las más parecidas entre sí de la familia, siendo homólogas en un 70% de la secuencia de MBD3. Sin embargo, mientras que MBD2 es un represor transcripcional que se une específicamente a ADN metilado, la proteínas MBD3 de ratón y humana no son capaces de unirse a secuencias metiladas (Hendrich and Bird, 1998). MBD2 interacciona específicamente con HDAC1 y es capaz de reclutar al complejo remodelador de cromatina NuRD a ADN metilado (Zhang et al., 1999). Además parece que MBD2 es el componente de unión a ADN metilado del complejo MeCP1 (Ng et al., 1999). MBD3 por su parte, forma parte del complejo Mi2/NuRD (Wade et al., 1999; Zhang et al., 1999), el cual contiene actividad deacetilasa de histonas. A pesar del alto grado de homología entre ellas, estas dos proteínas no son redundantes ya que los ratones deficientes en MBD2 son viables y fértiles mientras que la deficiencia de MBD3 causa letalidad durante el desarrollo embrionario (Hendrich et al., 2001).

MBD4 es la única proteína de la familia a la que no se ha relacionado con fenómenos de represión transcripcional y que no está asociada con proteínas deacetilasas de histonas. Como se ha mencionado anteriormente, contiene actividad glicosilasa y parece estar implicada en corregir apareamientos erróneos T/G (Hendrich et al., 1999; Millar et al., 2002).

Recientemente se ha descrito una nueva proteína de unión a ADN metilado que no contiene el dominio MBD. **Kaiso** es un represor transcripcional dependiente de metilación que necesita al menos dos CpG simétricamente metilados en la secuencia CGCG. Estos primeros estudios parecen indicar que Kaiso es también un componente

del complejo MeCP1 y del complejo correpresor N-CoR (Prokhortchouk et al., 2001; Yoon et al., 2003).

Por tanto, el nexo de unión entre la metilación del ADN y la represión transcripcional son las proteínas de unión a ADN metilado. Éstas reclutan proteínas con actividad deacetilasa y remodeladora de nucleosomas capaces de producir una compactación de la cromatina. Sin embargo, sabemos que la fuerza de unión de las proteínas con dominios MBD depende de la densidad de citosinas metiladas. Así, la metilación de secuencias reguladoras con una densidad alta de CpGs, da lugar a una unión estable de estas proteínas que conduce a la represión del gen. En regiones con una densidad baja de este dinucleótido, la unión de MBDs es más débil, y la actividad transcripcional puede reestablecerse en presencia de un *enhancer* fuerte (Boyes and Bird, 1992).

5. PAPEL DE LA METILACIÓN DEL ADN EN DIVERSOS PROCESOS BIOLÓGICOS

Desde un punto de vista funcional, la modificación del ADN por metilación juega un papel muy importante en varios procesos biológicos, entre ellos la inactivación del cromosoma X en hembras de mamíferos, el *imprinting* genómico, o el silenciamiento de secuencias parásitas. También se ha asociado con la represión de genes específicos de tejido durante el desarrollo de vertebrados.

5.1. Silenciamiento de secuencias parásitas

El 90% de los residuos de 5me-C en el ADN humano están asociados a transposones y retrovirus endógenos. Estas secuencias parásitas intragenómicas representan el 35% del genoma en mamíferos y se ha demostrado que la metilación de sus promotores conduce a una represión transcripcional e inactivación de estas secuencias (revisado en Yoder et al., 1997b). Además, embriones de ratones homocigotos *dnmt1*^{N/N}, que contienen sólo un 5% de los niveles de esta metilasa y un 30% del nivel total de metilación (Li et al., 1992), son capaces de transcribir retrovirus de la clase IAP (*intercisternal A particle*) (Walsh et al., 1998). Se ha propuesto por tanto, que la principal función de la metilación del ADN en vertebrados es limitar la expresión de secuencias parásitas y actuar como un mecanismo de defensa de la célula huésped (Walsh and Bestor, 1999). Esta función de defensa es similar a la que juega la

metilación en citosinas en hongos como *Neurospora crassa*, donde la fracción metilada del genoma está compuesta exclusivamente de secuencias duplicadas (Selker et al., 2003), y donde la pérdida de metilación reactiva al menos algunos de estos transposones (Zhou et al., 2001).

El silenciamiento de transposones es también la principal función de la metilación del ADN en plantas de la familia de las angiospermas. En ellas la metilación se produce en el carbono 5 de citosinas en secuencias CpG y CpNpG y afecta al 25% de las citosinas del genoma. Utilizando técnicas de mapeo a lo largo de todo el genoma en mutantes de metilación de *Arabidopsis* se demostró que la cromometilasa-3, responsable de mantener la metilación en secuencias CpNpG, metila preferentemente transposones (Tompa et al., 2002). Además se ha observado que la mutación de un gen capaz de reducir la metilación del ADN en *A. thaliana* (*ddm1*) es capaz tanto de reactivar transcripcionalmente transposones como de movilizarlos en el genoma (Miura et al., 2001; Singer et al., 2001).

Todos estos datos sugieren la posibilidad de que la metilación del ADN surgiese inicialmente como mecanismo de defensa, aunque el aumento en el tamaño y la complejidad de los genomas hizo que adquiriese además otras funciones más especializadas.

5.2. *Imprinting* genómico

El *imprinting* genómico es un sistema de regulación mediante el cual una serie de genes se expresan diferencialmente dependiendo del alelo (paterno o materno) de procedencia. Aunque los mecanismos que conducen a esta expresión monoalélica no se conocen completamente, se sabe que la metilación diferencial de ambos alelos juega un papel importante en este proceso (Feil and Khosla, 1999; Li et al., 1993a; Li et al., 1993b; Reik and Dean, 2001). En la mayoría de los casos, aunque no en todos, es el alelo materno el que está metilado y no se expresa. Este patrón de metilación se establece en la línea germinal y tras la fertilización se mantiene a lo largo del desarrollo embrionario, escapando al proceso de desmetilación que sufre el embrión durante el período previo a la implantación (Howell et al., 2001). Estas diferencias en el *imprinting* de los alelos sólo se eliminan en las etapas iniciales de la gametogénesis, para permitir que se reestablezcan adecuadamente en los gametos maduros dependiendo del sexo del nuevo organismo (revisado en Rand and Cedar, 2003).

5.3. Inactivación del cromosoma X en hembras de mamíferos

En hembras de mamíferos la compensación de dosis génica se consigue por medio de la inactivación de uno de los dos cromosomas X, en un proceso que ocurre muy temprano tras la fertilización. La inactivación se produce al azar en uno de los cromosomas en el ectodermo primitivo del blastocisto (que dará lugar al embrión propiamente dicho), mientras que está regulada por *imprinting* en el tejido extraembrionario (Wang et al., 2001). Desde el punto de vista estructural consiste en el empaquetamiento de uno de los cromosomas en una estructura de heterocromatina compacta y transcripcionalmente inactiva.

Aunque todavía no se conocen con detalle los mecanismos moleculares que dan lugar al silenciamiento estable de uno de los cromosomas X en el embrión, se sabe que su inicio depende de la síntesis de un ARN no codificante denominado Xist, que recubre el cromosoma que se va a inactivar. Por otra parte, el mantenimiento del estado inactivo y el silenciamiento de los genes asociados, dependen de la metilación del ADN y deacetilación de histonas a lo largo del cromosoma (revisado en (Avner and Heard, 2001; Li, 2002). Un ejemplo lo encontramos en ratones homocigotos deficientes en DNMT1 que son capaces de reactivar un transgén ligado al cromosoma X cuando los niveles de metilación alcanzan un mínimo. Sin embargo, el establecimiento de la inactivación no se ve alterado en estos ratones, aunque no se puede descartar que los niveles maternos de DNMT1 y la presencia de las metilasas *de novo* DNMT3A y DNMT3B puedan ser suficiente para iniciar el proceso (Sado et al., 2000).

5.4. Regulación de la expresión de genes específicos de tejido durante el desarrollo embrionario

Aunque todavía no se conocían los mecanismos que dan lugar al patrón de metilación en vertebrados, en 1975 se propuso por primera vez que la desmetilación de secuencias reguladoras de una forma específica de tejido podría jugar un papel central en la regulación de la expresión génica durante el desarrollo embrionario (Holliday and Pugh, 1975; Riggs, 1975). De acuerdo con esta hipótesis, en muchos genes se ha observado una correlación entre activación transcripcional y desmetilación de CpGs en sus secuencias reguladoras (véase el apartado 3 de esta tesis), aunque no está claro si esta desmetilación es causa o consecuencia de la transcripción a lo largo del gen. Por otra parte, la metilación *in vitro* de secuencias reguladoras inhibe la expresión de genes

debido al reclutamiento de complejos con actividad deacetilasa de histonas (Jones et al., 1998; Nan et al., 1998).

A pesar de esto, existen una serie de datos que no corroboran esta hipótesis. En primer lugar, cuando se analizó el patrón de metilación de una serie de genes en ratones, no se encontró ninguna correlación clara entre la desmetilación de sus secuencias reguladoras y la expresión del gen. Además, ratones deficientes en DNMT1 no tienen un patrón de expresión alterado de ninguno de los genes específicos de tejido analizados, en condiciones que causan reactivación de secuencias parásitas y expresión bialélica de genes regulados por *imprinting* (Walsh and Bestor, 1999). Basándose en estos datos, y en la observación de que organismos modelo como *Caenorhabditis elegans* o *Saccharomyces cerevisiae* no contienen nucleótidos metilados, estos autores propusieron que la metilación del ADN juega un papel de defensa frente a secuencias parásitas, pero que no es un mecanismo general de regulación de la expresión génica durante el desarrollo.

Sin embargo, en los últimos tres años han aparecido una serie de trabajos que obligan a revisar la hipótesis de Bestor y Walsh. En embriones de *Xenopus*, por ejemplo, la eliminación de xDNMT1 antes de que comience la transcripción zigótica conduce a la activación prematura de una serie de genes, lo que sugiere que la metilación del ADN contribuye al silenciamiento de genes antes de la transición de midblastula (Stancheva et al., 2002; Stancheva and Meehan, 2000). Recientemente también se ha observado expresión ectópica del gen de interleukina 4 (IL-4) en ratones deficientes en DNMT1 y en la proteína de unión a ADN metilado MBD2 (Hutchins et al., 2002; Makar et al., 2003).

6. METILACIÓN DE ADN, MODIFICACIÓN DE HISTONAS Y COMPLEJOS REMODELADORES DE LA CROMATINA

La conexión entre la metilación del ADN, la estructura de la cromatina y la represión de la expresión génica se conoce desde hace años.

Como hemos visto, las proteínas de unión a ADN metilado están asociadas con HDACs, y complejos remodeladores de cromatina. Además agentes inhibidores de deacetilasas pueden reactivar genes metilados *in vitro* (revisado en Razin, 1998). Por otra parte, la cromatina que se forma alrededor del ADN metilado está enriquecida en la histona H1, mientras que esta proteína apenas se encuentra en regiones libres de

metilación (Tazi and Bird, 1990). H1 juega un papel muy importante en la compactación de los nucleosomas y en la formación de cromatina transcripcionalmente inactiva. Recientemente se ha observado también que la metilación del ADN se asocia *in vivo* con deacetilación de la histona H4 y con desmetilación de la lisina 4 de la histona H3, características ambas de cromatina inactiva (Hashimshony et al., 2003). Sin embargo, el nexo más sorprendente entre la metilación en el ADN y las modificaciones en las colas de las histonas se ha observado en *Neurospora crassa* y *Arabidopsis thaliana*. En estos organismos las proteínas responsables de la metilación en la lisina 9 de la histona H3 (modificación relacionada con cromatina inactiva) controlan la metilación en el ADN (Jackson et al., 2002; Tamaru and Selker, 2001).

Por otra parte, se ha visto también que proteínas remodeladoras de la cromatina de la familia de SNF2, como DDM1 en *A. thaliana* y Lsh o ATRX en mamíferos, son capaces de alterar los patrones de metilación genómica (Dennis et al., 2001; Gibbons et al., 2000; Jeddeloh et al., 1999). Mutaciones de ATRX en humanos dan lugar al síndrome de α -talasemia ligada al cromosoma X. Todo esto indica que la modificación del ADN por metilación, y los cambios en la estructura de la cromatina están íntimamente relacionados, y que esta relación, al contrario de lo que se pensaba inicialmente, es bidireccional.

7. CÉLULAS MADRE HEMATOPOIÉTICAS

Un buen sistema para estudiar el papel que juega la metilación del ADN en la formación de cromatina activa durante el desarrollo son las células madre. En un organismo adulto, existe un pequeño número de células capaces de dividirse indefinidamente por un lado, y de diferenciar a células de varios linajes distintos por otro. De entre ellas, las más estudiadas son las células madre hematopoiéticas (HSC), encargadas de proveer al organismo con los 8 tipos distintos de células sanguíneas a lo largo de toda su vida. Estas células, aisladas de médula ósea de ratones adultos, son capaces de dividirse *in vivo* dando lugar a dos células hijas iguales, de diferenciarse a todos los tipos de células de sangre, y de reconstituir un sistema hematopoiético tanto en ratones como en humanos (revisado en Weissman et al., 2001) (Ver también fig. 3). En ratón existen tres poblaciones distintas capaces de reconstituir un sistema hematopoiético. Las células madre hematopoiéticas con capacidad de reconstitución a largo plazo (LT-HSC) son capaces de autorrenovarse indefinidamente, mientras que las

células madre con capacidad de reconstitución a corto plazo (ST-HSC) sólo son capaces de dividirse *in vivo* durante aproximadamente 6 semanas. Los progenitores multipotentes (MPP) aunque no tienen capacidad de autorrenovarse, son capaces de reconstituir un sistema hematopoiético durante cierto tiempo. Las células LT-HSC dan lugar a células ST-HSC las cuales a su vez dan lugar a MPPs, y hasta el momento no se ha detectado desdiferenciación en este linaje (Morrison et al., 1997).

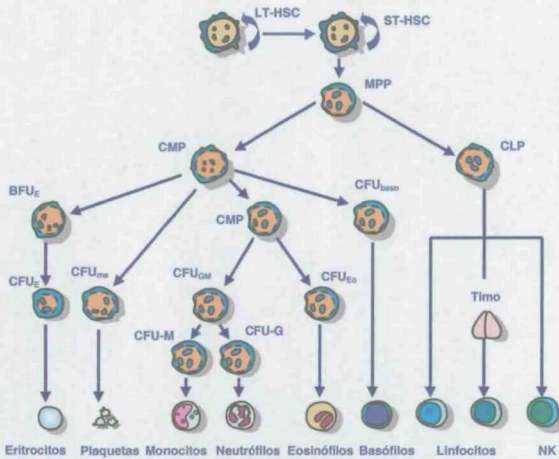


Fig. 3. Esquema del sistema hematopoiético adulto de mamíferos. Las células madre hematopoiéticas con capacidad de reconstitución a largo plazo (LT-HSC) dan lugar a las células madre con capacidad de reconstitución a corto plazo (ST-HSC) y estas a su vez a los precursores multipotentes (MPP). Los MPP dan lugar a dos tipos de precursores: progenitores comunes linfoides (CLP) que acaban generando linfocitos y células *natural killer* (NK), y progenitores comunes mieloides (CMP), que darán lugar al linaje mieloides. BFU_E: unidades formadoras de focos, CFU_E, me, GM, Eo, baso, M, G: unidades formadoras de colonias (eritroides, megacariocitos, granulocitos y macrófagos, eosinófilos, basófilos, granulocitos y macrófagos).

A pesar de que inicialmente se pensó que las células madre en organismos adultos eran específicas de tejido, varios experimentos recientes sugieren que células madre específicas de un tejido diferenciado pueden tener una capacidad limitada de transdiferenciación hacia células de otros tejidos. Este fenómeno se conoce con el nombre de plasticidad celular. Por ejemplo, se ha descrito que poblaciones enriquecidas

en HSC son capaces de diferenciar hacia músculo esquelético (Ferrari et al., 1998; Gussoni et al., 1999), músculo cardíaco (Jackson et al., 2001; Orlic et al., 2001), endotelio (Grant et al., 2002), células epiteliales (Krause et al., 2001), neuroectodermo (Brazelton et al., 2000; Mezey et al., 2000) o hepatocitos (Lagasse et al., 2000). Al mismo tiempo, poblaciones celulares procedentes de cerebro o músculo son capaces de reconstituir un sistema hematopoiético en ratones irradiados (Bjornson et al., 1999; Jackson et al., 1999). Sin embargo, esta supuesta plasticidad celular se ha visto sometida a varias críticas, como que las poblaciones iniciales podrían estar contaminadas con células de otros tejidos (revisado en Lemischka, 1999; Verfaillie, 2002; Weissman et al., 2001) o que el potencial de transdiferenciación fuese en realidad el resultado de una fusión celular espontánea (Terada et al., 2002; Ying et al., 2002). A pesar de todo, en algunos estudios la transdiferenciación se produjo cuando se inyectaron neuroesferas procedentes de células individuales, lo que excluye una posible contaminación con otros tipos celulares (Bjornson et al., 1999; Clarke et al., 2000). Por otra parte, la regeneración hepática observada por Lagasse y cols. (Lagasse et al., 2000) se obtuvo a partir de diluciones de HSC altamente purificadas que además expresaban el marcador lacZ. Aunque estos resultados pueden ser explicados por un mecanismo de fusión celular, la frecuencia de este suceso es menor que la observada para algunos de los estudios de trasplante *in vivo* (Terada et al., 2002).

Una cuestión fundamental es analizar como se consigue el elevado potencial de diferenciación por un lado, y en su caso esta capacidad de transdiferenciación. Experimentos de clonaje en mamíferos utilizando núcleos de células somáticas, indicaron que para que el clonaje fuese eficiente se necesita una desmetilación previa del genoma (Humpherys et al., 2001). Por otra parte se ha sugerido que una reprogramación similar podría jugar un papel importante en la transdiferenciación de células madre (Reik et al., 2001).

8. MIOGÉNESIS EN EMBRIONES DE RATÓN

La formación de músculo esquelético en vertebrados comprende dos procesos fundamentales. En primer lugar, los precursores miogénicos en las somitas se ven comprometidos a un fenotipo muscular en un proceso que se conoce como **determinación**. A continuación estas células (mioblastos) migran hacia los futuros músculos donde se fusionan entre sí para dar lugar a células postmitóticas

multinucleadas (miotubos) que adquieren un fenotipo contráctil. Al mecanismo responsable de este proceso se le denomina **diferenciación**. Ambos procesos vienen controlados por una familia de factores de transcripción denominados MRFs (*Muscle Regulatory Factors*) que contienen un dominio de unión a ADN tipo bHLH (*basic Helix-Loop-Helix*). Estos genes son específicos de músculo esquelético y sus productos se unen a secuencias específicas de ADN denominadas cajas E (CANNTG), generalmente en forma de heterodímeros con proteínas de la familia E2 (Lassar et al., 1991). De las cuatro proteínas que forman la familia, Myf5 y MyoD han sido implicadas en el proceso de determinación muscular, mientras que miogenina y MRF4 (herculina) son las responsables de la diferenciación de precursores musculares a miotubos. Todos ellos son capaces de activar el programa de diferenciación miogénica cuando se expresan ectópicamente en células no musculares (Braun et al., 1990; Braun et al., 1989; Davis et al., 1987; Miner and Wold, 1990; Rhodes and Konieczny, 1989; Wright et al., 1989).

Durante el desarrollo embrionario en roedores, Myf5 y MRF4 son los primeros en aparecer en las somitas más rostrales de embriones de e8, aunque en distintas subpoblaciones de células (Ott et al., 1991; Summerbell et al., 2002). Medio día más tarde aparece miogenina, seguida por MyoD (e10.5) (Sassoon et al., 1989). Sin embargo, la expresión de MRF4 y de Myf5 es transitoria, y ambos se reprimen hacia el e11 o e12 respectivamente, aunque MRF4 se reactiva en embriones de e14.5 (Bober et al., 1991). Este último es el factor bHLH miogénico mayoritario en músculo esquelético adulto (Zhang et al., 1995).

La segunda familia de proteínas importante en el control de la diferenciación muscular está constituida por los factores MEF2 (*Myocyte enhancer factor 2*). Los genes MEF2A, 2B, 2C y 2D dan lugar a fosfoproteínas nucleares pertenecientes a la familia de proteínas de unión a ADN con un dominio MADS (*MCMI, Agamous, Deficiens, Serum response factor*) (Olson et al., 1995). También en este caso, la expresión ectópica de MEF2A es capaz de convertir fibroblastos 10T1/2 a un fenotipo muscular similar al obtenido con las proteínas de la familia bHLH (Kaushal et al., 1994). Además en las regiones reguladoras de muchos genes específicos de músculo encontramos tanto cajas E como sitios de unión para proteínas MEF2 (Molkentin and Olson, 1996).

En la activación de algunos genes musculares como miogenina, juegan también un papel importante proteínas de la familia Six. Ésta está compuesta por seis miembros

de los cuales Six1 y Six4 son muy abundantes en músculo esquelético de ratones adultos. Six1 además es abundante en somitas en embriones de e8.5 (Spitz et al., 1998).

La primera conexión entre la metilación del ADN y músculo fue la observación de que el tratamiento con 5-azacitidina (inhibidor competitivo de metiltransferasas) convierte fibroblastos 10T1/2 en células con fenotipo muscular, y es precisamente esta observación lo que llevó al clonaje y caracterización de MyoD (Taylor and Jones, 1982). Este fenómeno también ocurre tras la transfección de un ARN antisentido para DNMT1 en fibroblastos 10T1/2 (Szyf et al., 1992). Por otro lado, se ha descrito que el *enhancer* distal de MyoD se desmetila durante el proceso de somitogénesis en ratones, y que dicha desmetilación es previa a la activación del gen (Brunk et al., 1996). Este efecto de la metilación del ADN en la regulación de genes específicos de músculo se pone de manifiesto también con la observación de que el tratamiento con azacitidina induce diferenciación y expresión de miogenina en células C2C12 (Lucarelli et al., 2001). Por todo esto, pensamos que el gen de miogenina de ratón es un buen modelo para estudiar el posible papel de la metilación del ADN en restringir la expresión de genes específicos de músculo durante el desarrollo embrionario.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

El objetivo general de esta tesis fue estudiar si la metilación de secuencias reguladoras con una densidad baja en CpGs juega algún papel en la activación inicial de genes hematopoiéticos y musculares durante el desarrollo en ratón.

Los objetivos concretos del trabajo han sido:

Analizar desde qué estado, en términos de metilación de ADN, se activan inicialmente las regiones reguladoras de una serie de genes hematopoiéticos (β -globina, mieloperoxidasa y el gen de la cadena pesada de las inmunoglobulinas) y musculares (miogenina) en células madre hematopoiéticas procedentes de ratones adultos.

Analizar el nivel de metilación del promotor de miogenina durante el proceso de somitogénesis en embriones de día 9.5, y compararlo con el nivel de metilación en músculo esquelético de ratones neonatos.

Estudiar el papel de los distintos factores de transcripción en la activación del promotor de miogenina en células musculares C2C12, así como analizar la expresión de estos factores en somitas de embriones de día 9.5.

Investigar el papel de la metilación del promotor de miogenina en la formación de cromatina activa. Determinar si se necesitan más factores de transcripción para activar desde un estado metilado y comparar la cinética de formación del sitio de hipersensibilidad del promotor metilado con la del promotor sin modificar.

Estudiar si los factores de transcripción musculares son capaces de desmetilar el promotor de miogenina metilado *in vitro* y transfectado en células C2C12 en respuesta a estímulos de diferenciación.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

I. MATERIALES

1. LÍNEAS CELULARES

1.1. Células MEL

Línea celular derivada de células de eritroleucemia de ratón (Ross et al., 1974). Se cultivaron en medio DMEM con un 10% de suero fetal de ternera (SFT), 100 U/ml de penicilina y 0.1 mg/ml de estreptomicina a 37°C con un 95% de humedad y en un ambiente de 5% CO₂

1.2. Proeritroblastos (precursores hematopoiéticos)

Línea celular derivada de médula ósea de ratones en los que se dirigió la expresión del oncogén TAg (sensible a temperatura) del virus SV40 hacia precursores hematopoiéticos utilizando el promotor y *enhancer* del factor de transcripción GATA-1 (Cairns et al., 1994). Las células de médula ósea inmortalizadas de dichos ratones crecen a 32°C, pero no a 38°C y dependen para su crecimiento de eritropoietina (Epo) o de interleukina 3 (IL-3). Las células que se utilizaron en este trabajo crecen en presencia de Epo y se caracterizan por ser capaces de dar lugar a células tanto eritroides como mieloides. Se cultivaron en medio RPMI con 10 % SFT y 0.5 U/ ml de Epo a 32°C con un 95% de humedad y en un ambiente de 5% de CO₂.

1.3. Células C2C12

Línea celular derivada de mioblastos de ratón establecida por Yaffe y Saxel (Yaffe and Saxel, 1977). Dicha línea puede diferenciar rápidamente a miotubos con síntesis de proteínas musculares. Se cultivaron en medio DMEM suplementado con 10% de SFT, 4mM de L-glutamina, 100 U/ml penicilina y 0.1 mg/ml estreptomicina a 37°C con un 95% de humedad y en un ambiente de 5% CO₂. En dichas condiciones las células son capaces de dividirse indefinidamente, siempre que no se permita a los cultivos alcanzar un estado de confluencia. Una vez alcanzado, las células se diferencian irreversiblemente a miotubos y disminuye la población mioblástica del cultivo. Para

inducir su diferenciación a miotubos, se les retiró el SFT y se pasaron a medio suplementado con un 2% de suero de caballo (SC).

1.4. Células CV-1

Línea celular derivada de células de riñón de mono verde africano, transformadas por el antígeno T del virus SV40 (Jensen et al., 1964). Estas células están bloqueadas en la cascada de diferenciación miogénica por debajo de las proteínas bHLH. Se cultivaron en las mismas condiciones que las células C2C12.

2. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Para aislar células madre hematopoiéticas se utilizaron ratones CBABL6 (CBA X Black 6) de entre 3 y 6 semanas de edad.

Para realizar los experimentos de expresión de miogenina *in vivo* así como para analizar el estado de metilación de su promotor se utilizó la línea GZ1092 (Yee and Rigby, 1993) proporcionada por el Dr. Dennis Summerbell (ICR, Londres). Dicha línea contiene el gen de lacZ fusionado a las secuencias comprendidas entre -1090 pb y + 5 pb del gen de miogenina de ratón. Estas secuencias contienen todos los elementos necesarios para una correcta expresión espacio-temporal del transgén, de tal modo que el patrón de expresión de lacZ reproduce fielmente la expresión del gen endógeno.

El mantenimiento y manipulación de los animales se llevó a cabo de acuerdo con la regulación de la Home Office (Animals Scientific procedures act 1986). Licencia número 70/4716.

3. PLÁSMIDOS

3.1 Plásmidos reporteros

GVA: Plásmido que contiene la secuencia genómica del gen de miogenina de ratón comprendida entre -4.25 kb y + 1.43 kb, clonado en el vector pBluscript S/K (+/-). Cedido por el Dr. Dennis Summerbell (Yee and Rigby, 1993).

PSTC: Plásmido que contiene el ADNc del receptor de glucocorticoides (GR) de rata unido al intrón IV y cola poliA de la β -globina de conejo (Severne et al., 1988).

GVA-P: Generado a partir del plásmido GVA, al que se ha fusionado el fragmento XhoI de 1.2 kb del plásmido PSTC. Dicho fragmento corresponde a la cola poliA del gen de la β -globina, y se utilizó para estabilizar los ARN mensajeros de la construcción, así como para diferenciar el transgén del gen endógeno.

-4.2 myo wt: Construido a partir de GVA-P, en el que se ha corregido la deaminación espontánea de la citosina situada en posición -10 con respecto al sitio de iniciación de la transcripción. Las secuencias de todos los oligonucleótidos utilizados para las distintas mutaciones, así como el método de mutagénesis están descritos en el apartado de mutagénesis dirigida.

-4.2 myf5mut: Generado a partir de la construcción -4.2 myo wt, en la cual se ha mutado la caja E proximal del promotor (situada entre las posiciones -17 y -12) para abolir la unión de factores de la familia bHLH. (Los nucleótidos mutados fueron los descritos en Yee and Rigby, 1993).

-4.2 mef2mut: Mutación del sitio de unión de factores de la familia de mef2 en el promotor de miogenina (situado entre las posiciones -69 a -60). Generado a partir de la construcción -4.2 myo wt mediante mutagénesis dirigida (Yee and Rigby, 1993).

-4.2 mef3mut: Mutación del sitio mef3 del promotor de miogenina (situado entre las posiciones -83 a -89) al cual se unen proteínas de la familia Six. Generado a partir de la construcción -4.2 myo wt mediante mutagénesis dirigida (Spitz et al., 1998).

-4.2 2/3mut, -4.2 2/5mut, -4.2 3/5mut y -4.2 2/3/5mut: Plásmidos en los que se mutaron los distintos sitios de unión previamente descritos en las combinaciones indicadas.

-1.09 myo wt-luc: Plásmido que contiene las secuencias comprendidas entre -1.09 kb y +100 del gen de miogenina, fusionadas al gen de la luciferasa. Fue obtenido tras clonar el fragmento SacI de 1.3 kb de -4.2 myo wt en el vector pGL3 de Promega.

-1.09 2/3/5-luc: Igual que el anterior, pero con los sitios mef2, mef3 y la caja E del promotor mutados. Obtenido tras clonar el fragmento SacI de -4.2 2/3/5mut en el vector pGL3.

Myo ADNc: Construcción que contiene el ADN codificante completo del gen de miogenina de ratón. Obtenido a través de I.M.A.G.E clones cDNA.

3.2. Vectores de expresión

EMSV-myf 5: Vector que contiene el ADNc del gen de Myf5 de ratón. Regalo del Dr. E Olson (Black et al., 1995).

pcDNA3-mef 2A: Plásmido que contiene el ADNc del gen de MEF2A. Cedido por el Dr. E Olson (Black et al., 1995).

PCR3-six 1: Plásmido que contiene el ADNc completo del gen Six 1 de ratón. Cedido por el Dr. P Maire (Spitz et al., 1998).

CMV- β gal: Contiene el ADNc de la enzima β galactosidasa de E.coli bajo el control del promotor del citomegalovirus (Promega). Se utilizó para normalizar la eficiencia de transfección.

pREP 7: Contiene el ADNc para el gen de resistencia a higromicina bajo el control del promotor del virus de la timidina kinasa (Invitrogen)

3.3 Vectores “vacíos”

pGL3: Plásmido que contiene el gen de la luciferasa de luciérnaga (Promega).

pBluescript S/K (+/-): Vector de clonaje de Stratagene. Se utilizó para mantener la cantidad de ADN constante en las distintas transfecciones.

3.4. Sondas

Myo1: Fragmento HinfI-EcoRI de 358 pb situado entre las posiciones +1122 y +1480 del gen de miogenina.

Myo2: Se utilizó el fragmento comprendido entre las secuencias +1763 y +2107 del gen completo de miogenina de ratón. Obtenido a partir del ADNc mediante amplificación por PCR. Los oligonucleótidos utilizados como cebadores fueron: 5'-GAGATTGTCTGTCAGGCTGGG-3' y 5'-GGCACTCATGTCTCTCAAACGG-3'

β -globina: Fragmento de 300pb procedente de la digestión EcoRI-ScaI del plásmido PSTC. Corresponde a la cola poliA del gen de β -globina de conejo.

4. ANTICUERPOS

El kit de enriquecimiento en células progenitoras murinas StemSep (Metachem Diagnostics, Ltd) contiene un "cocktail" de anticuerpos monoclonales biotinilados (anti-CD5, anti-CD45R, anti-CD11b, anti-Gr-1 y 7-4 y anti-Ter-119). También contiene complejos tetraméricos biespecíficos anti-biotina:anti-dextrano.

Los anticuerpos utilizados para el aislamiento o caracterización de las distintas poblaciones hematopoiéticas por FACS fueron:

Anti-CD16/32 (Receptor Fc γ III/II) de ratón: anticuerpo monoclonal de rata (clon 2.4G2, isotipo IgG_{2b}) purificado. Anticuerpo de bloqueo (Pharmingen, 553141).

IgG_{2a} e IgG_{2b} de rata: anticuerpos monoclonales de rata acoplados a ficoeritrina (PE) o fluoresceína (FITC). Controles de isotipo (Pharmingen).

Anti-c-kit (CD117) de ratón: anticuerpo monoclonal de rata (clon 2B8, isotipo IgG_{2b}) acoplado a PE (Pharmingen, 01905B).

Anti-Sca-1(Ly-6/E) de ratón: anticuerpo monoclonal de rata (clon D7, isotipo IgG_{2a}) acoplado a FITC (Pharmingen, 01164A).

Anti-CD5 (Ly-1) de ratón: anticuerpo monoclonal de rata (clon 53-7.3, isotipo IgG_{2a}) acoplado a PE (Pharmingen, 01035A).

Anti-CD11b (Cadena α_M de integrinas, cadena α de Mac-1) de ratón: anticuerpo monoclonal de rata (clon M1/70, isotipo IgG_{2b}) acoplado a PE (Pharmingen, 01715A).

Anti-Ter 119 (Ly-76) de ratón: anticuerpo monoclonal de rata (clon TER-119, isotipo IgG_{2b}) acoplado a PE (Pharmingen, 09085B).

Anti-Gr-1 (Ly-6G) de ratón: anticuerpo monoclonal de rata (clon RB6-8C5, isotipo IgG_{2b}) acoplado a FITC (Pharmingen, 01214A).

Anti-CD45R (B220) de ratón: anticuerpo monoclonal de rata (clon RA3-6B2, isotipo IgG_{2a}) acoplado a FITC (Pharmingen, 553087).

Anti-CD3 (complejo molecular) de ratón: anticuerpo monoclonal de rata (clon 17A2, isotipo IgG_{2b}) acoplado a PE (Pharmingen, 555275).

II. MÉTODOS

1. AISLAMIENTO DE CÉLULAS HEMATOPOIÉTICAS

1.1. Aislamiento de células madre hematopoiéticas: lin⁻, c-kit⁺, Sca-1⁺

Se extrajo la médula ósea de ratones CBABL6 de entre 3 y 6 semanas de edad, y se lisaron los eritrocitos con una solución 0.168 M de cloruro de amonio. Las células restantes (resuspendidas en PBS suplementado con 2% SFT), se bloquearon con suero de rata y se incubaron con un "cocktail" de anticuerpos biotinilados. A continuación se lavaron y se incubaron con anticuerpos tetraméricos anti-biotina:anti-dextrano. Estos se unieron a esferas magnéticas según las indicaciones del fabricante (StemSep, Metachem Diagnostics Ltd), y se pasaron por una columna de separación magnética. La fracción obtenida tras el paso por la columna está enriquecida en células que carecen de antígenos de superficie para los distintos marcadores hematopoiéticos y se denominan

linaje negativas (lin-). Dichas células se bloquearon con anticuerpos anti-CD32/CD16 y se marcaron con anticuerpos para c-kit y Sca-1 unidos a ficoeritrina (PE) e isotiocianato de fluoresceína (FITC), respectivamente. Las células doble positivas para ambos marcadores se separaron por FACS. Las células muertas se separaron de las vivas mediante tinción con yoduro de propidio o con topro, y se utilizó un FACS acoplado a una unidad de deposición celular automatizada (ACDU) de Becton and Dickinson.

1.2. Aislamiento de células B y T: B220+ y CD3+

Se aislaron de sangre de ratones CBABL6 adultos (3-6 semanas). Una vez lisados los eritrocitos como se describe en el apartado anterior, las células se incubaron con anticuerpos anti-B220 (anti-CD45R) unido a FITC (marcador de células B) y anti-CD3 unido a PE (marcador de células T), y se separaron por FACS las células positivas para uno u otro marcador. De nuevo, las células muertas se separaron de las vivas por tinción con yoduro de propidio o con topro.

2. DISECCIÓN DE TEJIDOS MUSCULARES

2.1. Disección de somitas en embriones de día 9.5

Para estos experimentos se utilizó la línea de ratones GZ1092 y las disecciones fueron realizadas por el Dr. Dennis Summerbell, en el Institute of Cancer Research, Londres. Brevemente consistieron en aislar embriones de día 9.5 (considerando día 0.5 a la mañana de aparición del tapón vaginal) y tras decapitarlos y eliminar el corazón, se aislaron las somitas eliminando en lo posible todas las estructuras axiales y el mesodermo lateral. A continuación el tejido mesodérmico restante se dividió en tres: la región que contiene el mesodermo presomítico y las somitas 1-3 aproximadamente para embriones de 25 somitas (y que de aquí en adelante denominaremos somitas posteriores), la región media que incluye las somitas 4-12, y la región que comprende las somitas 13-25 (somitas anteriores). La tinción con X-gal se realizó como se describe en (Yee and Rigby, 1993). Para los experimentos en los que se necesitaron células individuales, los tejidos se disgregaron mecánicamente y la suspensión celular se pasó por un filtro de 70 nm de diámetro. A continuación las células se depositaron en placas multipocillo con la ayuda de un FACS acoplado a una unidad de deposición celular automatizada (Becton and Dickinson). Las células vivas se separaron de las muertas mediante tinción con yoduro de propidio.

2.2. Disección de músculo esquelético en ratones neonatos

Para obtener un tejido que expresase cantidades elevadas del gen de miogenina *in vivo* se diseccionaron lenguas de ratones neonatos. Dicho tejido posee la ventaja de ser mayoritariamente muscular, siendo mínimas las contaminaciones con otros tipos celulares.

3. EXTRACCIÓN DE ADN Y ANALISIS POR BISULFITO DEL ESTADO DE METILACIÓN

Para analizar el estado de metilación de las regiones reguladoras estudiadas se utilizó el método establecido por Frommer y Clark (Frommer et al., 1992), con algunas modificaciones.

3.1. Extracción de ADN genómico

Aproximadamente 6000 células en el caso de células hematopoiéticas, o el fragmento de tejido completo correspondiente en el caso de embriones de 9.5 días se lisaron en un tampón conteniendo 100 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8, 25 mM EDTA, 0.5% SDS y 0.3 mg/ml PK, y se incubaron durante al menos 3 horas a 37°C. A continuación se extrajo el ADN con fenol: cloroformo y se precipitó con etanol. Antes de proceder con el tratamiento es conveniente digerir el ADN con una enzima de restricción que no este incluida en la región a analizar, para fragmentar el ADN genómico. En nuestro caso digerimos las muestras con XhoI o KpnI durante al menos 3 horas a 37°C, tras lo cual el ADN se reprecipitó y se resuspendió en agua.

3.2. Desnaturalización y tratamiento

La mitad del ADN de partida se desnaturalizó en presencia de 0.3 M de NaOH y de 5 µg de ARN de levadura en un volumen total de 55.5 µl y se incubó durante 20 minutos a 42°C. A continuación se añadieron 600 µl de una solución saturada de bisulfito sódico (entre 5.20-5.69 M de HSO_3^- (ACS reagent grade Sigma), 10mM de hidroquinona (Sigma), pH 5), se cubrieron las muestras con una capa de aceite mineral (Sigma) y se incubaron en la oscuridad durante 2.5 horas a 55°C.

3.3. Eliminación del exceso de sales y desulfonación

Una vez tratadas, se eliminó el exceso de bisulfito mediante la utilización del “kit” Wizard DNA Clean-Up systems de Promega siguiendo las instrucciones del fabricante, y el ADN se eluyó en TE. A continuación se procedió a desulfonar las muestras mediante la adición de NaOH a una concentración de 0.3 M, e incubación a 37°C durante 15 minutos. Una vez finalizado el tratamiento, el ADN se precipitó con etanol, en presencia de 0.8 M de acetato de amonio y 20 µg de glucógeno, y se resuspendió en 20 µl de agua o TE (0.1 mM EDTA)

3.4. Amplificación por PCR, clonaje y secuenciación

Para las siguientes reacciones de PCR se utilizaron 5 µl del ADN tratado, y se sometieron las muestras a dos rondas de amplificación (utilizando 1 µl de la primera ronda en la segunda reacción de PCR). Todas las PCRs se realizaron en 50 µl del tampón 1X suministrado por el fabricante con 1 µM de cada cebador, 200 µM de cada dNTP y 1.25 U de Taq (Takara Bio Inc). Las condiciones y los oligonucleótidos utilizados para cada reacción en concreto están indicados en la tabla 1.

Gen		Oligonucleótidos	T ^a (°C)	Ciclos
IgH	1ª ronda	agggaattcTGAGGTTTTGTTGTGTAGAAATTG	52	40
		agggtctagaAAAATCCTTCAATTTCTTACATAACC		
	2ª ronda	agggaattcGTGTAGAAATTGATATTATTAAAG	52	40
		agggtctagaTAAATTAAAAAAAACCTCTCC		
MPO	1ª ronda	gccgaattcGAGTATTGTAGTTAGTTTTTGAGG	52	30
		atatctagaACAATCAAACCTCAACCCCTACC		
	2ª ronda	gccgaattcGAGTATTGTAGTTAGTTTTTGAGG	52	35
		aattctagaACCCCAACCCCAAAAAACATCCC		
EpoR	1ª ronda	agggaattcGGGAAGAGATATTGGTTGGAG	54	30
		agggtctagaCCTAAATTTATCCATAATAACAACCC		
	2ª ronda	agggaattcGGGAAGAGATATTGGTTGGAG	54	35
		cgggtctagaTAACTTCAAAAAACTCAAACTCC		
miogenina	1ª ronda	atagaattcTGGGTTAGGGGTAGGTTTGATG	62	22
		agggtctagaCCCCATCATAAAAAATAAACTCC		
	2ª ronda	agggaattcGGGGAATTATATGTAATTTATTGG	62	25
		agggtctagaCCCCATCATAAAAAATAAACTCC		

Tabla 1. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para el análisis de metilación tras el tratamiento con bisulfito sódico, y condiciones (temperatura de anillamiento y número de ciclos) de las PCRs. Las bases indicadas en letras minúsculas han sido introducidas artificialmente y las dianas de restricción para EcoRI y Xba vienen señaladas en azul.

A continuación se purificaron los productos de PCR y o bien se secuenciaron directamente utilizando el “kit” Ready Reaction DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems) o se procedió a su clonaje en pBluescript S/K(+/-) aprovechando las dianas de restricción incluidas en los cebadores (EcoRI-XbaI). Estos productos se transformaron en la cepa bacteriana DH5- α , y a partir de ahí se secuenciaron clones individuales. Las reacciones de secuenciación se separaron y analizaron en un secuenciador ABI Prism DNA sequencer 377 (Applied Biosystems)

Para cada experimento el tratamiento se repitió al menos dos veces (normalmente tres) y se secuenciaron entre 10 y 20 clones por tratamiento.

3.5. Análisis por bisulfito de fragmentos de ADN plasmídico

Se partió de 100 ng de ADN y se procedió como se ha descrito anteriormente con la diferencia de que sólo es necesaria una ronda de PCR. En este caso los productos se secuenciaron directamente utilizando un secuenciador ABI Prism DNA sequencer 377.

3.6. Análisis por bisulfito de ADN genómico procedente de células transfectadas establemente

Las células C2C12 se recogieron tras 5-7 días en medio de diferenciación (DMEM suplementado con 2% SC) y se lisaron como se menciona en el apartado 7 (Mapeo con DNasa I y ensayos de accesibilidad a enzimas de restricción/ Extracción de núcleos). Entre 1 y 2 μ g así obtenidos se utilizaron para el tratamiento con bisulfito como se indica arriba. En este caso, de nuevo sólo es necesaria una ronda de PCR.

3.7. Análisis por bisulfito de ADN plasmídico procedente de células transfectadas transitoriamente

El ADN plasmídico de células C2C12 transfectadas y diferenciadas durante 6 días se extrajo según el método descrito por Hirt (Hirt, 1967). Brevemente, las placas se lavaron con PBS y las células se lisaron con 800 ml de la solución Hirt I (0.6% SDS,

10 mM Tris pH 8 y 1 mM EDTA). A continuación se añadieron 200 ml de la solución Hirt II (5 M NaCl, 10 mM Tris pH 8 y 1 mM EDTA), y se recogieron los lisados celulares. Estos se centrifugaron a 14000 rpm en frío y el ADN se obtuvo tras extracción con fenol:cloroformo y posterior precipitación con etanol en presencia de acetato de amonio. Entre 1 y 2 µg de ADN así obtenidos se trataron como se ha descrito más arriba. También en este caso sólo es necesaria una ronda de PCR.

4. MUTAGÉNESIS DIRIGIDA

Las construcciones con las distintas mutaciones en el promotor del gen de miogenina se obtuvieron mediante mutagénesis dirigida. Se utilizó el plásmido -4.2 myo wt como molde inicial y el "kit" QuickChangeXL de Stratagene, siguiendo el protocolo suministrado por el fabricante. Los pares de oligonucleótidos utilizados para la mutación de cada uno de los sitios de unión fueron los siguientes:

myf5-wt	GGTTTAAATGGCACCCAGCAGTTGGCGTGAGGGGCTGCGG
myf5-mut	5'-GGTTTAAATGGCACCCAGtgGTcaGCGTGAGGGGCTGCGG-3' 3'-CCGCAGCCCTCACGtgACcaCTGGGTGCCATTAAACC-5'
mef 2-wt	GGTTTCTGTGGCGTTGGCTATATTATCTCTGGGTTCATGC
mef 2-mut	5'-GGTTTCTGTGGCGTTGGCTTATTaATCTCTGGGTTCATGC-3' 3'-GCATGAACCCAGAGATtAATAaAGCCAACGCCACAGAAACC-5'
mef 3-wt	CAGCTTAGAGGGGGGCTCAGGTTTCTGTGGCGTTGGCTATAT

Para la obtención de mef 3 mut fueron necesarias dos rondas de mutagénesis

mef 3-mut	5'-CAGCTTAGAGGGGGGCTCgaGTTgCTGTGGCGTTGGCTATAT-3' 3'-ATATAGCCAACGCCACtGcAACTcGAGCCCCCTCTAAGCTG-5'
	5'-CAGCTTAGAGGGGGGCTCgaGgggCaGTGGCGTTGGCTATAT-3' 3'-ATATAGCCAACGCCACtGcccCtcGAGCCCCCTCTAAGCTG-5'

Para obtener el plásmido -4.2 myo-wt fue necesario corregir la deaminación espontánea de la citosina en posición -10 a timidina en el clon inicial (plásmido GVA-P). Para ello se utilizaron los siguientes oligonucleótidos:

GVA-P	GCACCCAGCAGTTGGTGTGAGGGGCTGCG
-4.2 myo-wt	5'-GCACCCAGCAGTTGGcGTGAGGGGCTGCG-3'
	3'-CGCAGCCCCTCACgCCAAGTCTGGGTGC-3'

Todas las mutaciones se comprobaron mediante secuenciación.

5. METILACIÓN *in vitro* DEL ADN

Para metilar ADN plasmídico, se utilizó la metilasa bacteriana SssI (NE Biolabs) siguiendo las indicaciones de la casa comercial. El ADN se incubó con 1.5 U enzima/ μ g de ADN en presencia del tampón NE2 1X y 160 μ M S-adenosil-L-metionina (SAM) durante la noche a 37°C. En todos los casos el ADN “no metilado” se trató en las mismas condiciones, excepto que no se añadió SssI a la reacción. Para comprobar si la reacción había sido completa, se procedió a digerir el ADN metilado con la enzima sensible a metilación HpaII, y se comparó con el ADN sin metilar. Cuando el ADN se utilizó posteriormente para la generación de líneas estables, nos aseguramos de que la reacción había sido completa mediante tratamiento con bisulfito y posterior secuenciación de los productos de PCR (ver apartado 3)

6. ENSAYOS DE EXPRESIÓN TRANSITORIA

6.1. Transfecciones

Las células C2C12 se transfectaron utilizando LipofectamineTM reagent (Invitrogen). 24 horas antes de la transfección se plaquearon $3.5\text{--}3.6 \times 10^5$ células por placa de 60 mm en el medio normal de cultivo. Al día siguiente, y cuando las células se encontraban a un 80-90 % de confluencia se sustituyó el medio por un medio sin suero (y sin antibióticos) y se transfectaron con las cantidades de ADN indicadas al pie de cada figura. Brevemente, 3 μ g de ADN totales se mezclaron con los liposomas y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación se añadió esta

mezcla sobre las células y se dejó actuar durante 5-6 horas a 37°C. Una vez transcurrido este tiempo, se lavaron las células con medio sin suero, y se dejaron en DMEM 10% SFT, durante al menos 16 horas. Para inducir su diferenciación las células se pasaron a DMEM con 2% SC y se cultivaron en esas condiciones durante otras 48-72 horas.

Las células CV-1 se transfectaron por el método tradicional de precipitación con fosfato cálcico. 24 horas antes de la transfección se plaquearon 3.3×10^5 células por placa de 60 mm, en medio normal de cultivo. Al día siguiente, y tres horas antes de iniciar la transfección, se cambió el medio y se añadió medio nuevo. Los precipitados se formaron con las cantidades de ADN indicadas al pie de la figura y se añadieron sobre las células. 16 horas después de añadir los precipitados se lavaron las células y se incubaron en medio con 2% SC durante 48-72 horas.

Todos las transfecciones se hicieron por duplicado y cada experimento se repitió al menos tres veces. Una vez finalizado el tratamiento, se lavaron las placas con PBS y se recogieron en 150 µl de tampón de lisis de Promega 1X

6.2. Medida de la actividad β-galactosidasa

20 µl de cada extracto se diluyeron con 30 µl de agua y se incubaron con 50 µl de tampón β-galactosidasa 2X (200mM de tampón fosfato pH 7.5), 2 mM de MgCl₂, 1.33 mg/ml ONPG (o-nitrofenil-β-D-galactopiranosido) y 100 mM de β-mercapto-etanol) durante 30 minutos a 37°C. La intensidad del color resultante se midió como absorbancia a 405 nm en un lector de ELISA.

6.3. Medida de la actividad luciferasa

20 µl de extracto se utilizaron para determinar la actividad luciferasa de las muestras siguiendo las indicaciones del sistema de ensayo de Promega en un luminómetro Berthold-BioLumat.

7. ENSAYO DE RETARDO DE LA MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA EN GEL (EMSA)

Se plaquearon 3.6×10^5 células C2C12 por placa de 60 mm en medio con 10% SFT y 36 horas después se sustituyó el medio por otro suplementado con 2% SC. Las células se recogieron a las 48 horas de inducir su diferenciación.

7.1. Preparación de extractos nucleares (protocolo adaptado de Andrews and Faller, 1991)

Las placas se lavaron con PBS frío y las células se recogieron en ese tampón. A continuación se centrifugaron a 13000 rpm durante 30 segundos y se resuspendieron en 400 µl de tampón A (10 mM Hepes-KOH pH 7.9, 10mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.5 mM DTT y 0.2 mM PMSF). Tras incubarlas en hielo durante 10 minutos, las muestras se centrifugaron de nuevo 30 segundos a 13000 rpm y los núcleos se resuspendieron en 50 µl de tampón C (20 mM Hepes-KOH pH 7.9, 25 % glicerol, 420 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT y 0.2 mM PMSF). Para extraer las proteínas nucleares se incubaron las muestras en hielo durante 20 minutos y se agitaron vigorosamente con vórtex, tras lo cual se centrifugaron a 4°C y se recogió el sobrenadante. Los extractos nucleares se cuantificaron por el método de Bradford (Bradford, 1976) y se guardaron a -70°C.

7.2. Marcaje de la sonda

Los oligonucleótidos utilizados para realizar los ensayos de retardo en gel fueron los siguientes:

CajaE: 5'-CACCCAGCAGTTGGCGTGAGG-3'
3'-GTGGGTCGTCAACCGCACTCC-5'

CajaE-m: 5'-CACCCAGCAGTTGG^mCGTGAGG-3'
3'-GTGGGTCGTCAACCG^mCACTCC-5'

Para obtener una sonda de doble cadena, primero se anilló cada oligonucleótido con su complementario. Para ello se incubaron 1000 pmoles de cada uno de ellos en un tampón conteniendo 10 mM de Tris pH 8, 1 mM EDTA y 0.1 M NaCl. A continuación se incubaron a 95°C durante 5 minutos y se dejó que la temperatura descendiese gradualmente durante al menos 4 horas a temperatura ambiente.

Para marcar radiactivamente los oligonucleótidos de doble cadena se utilizaron 100 ng y se incubaron con 25 µCi de [³²P]-ATP y 5 unidades de la enzima polinucleótido kinasa del fago T4 (T4 PNK) en el tampón kinasa 1X de Promega, durante 30 minutos a 37°C. A continuación se eliminó el exceso de ATP radiactivo no

incorporado mediante una columna de exclusión molecular G-25 (Amersham-Biosciences) y se midió la actividad de la sonda en un contador tipo Cerenkov.

7.3. Incubación de los extractos nucleares con la sonda radiactiva

1, 3, 5 y 7 µg de extracto se incubaron durante 20 minutos en hielo con 20000 c.p.m de sonda en un tampón conteniendo 10 mM Tris pH 8, 50 mM NaCl, 0.5 mM DTT, 10% glicerol, 0.05% NP-40, 2mM EDTA, 300 µg/ml BSA y 1 µg polidIdC.

7.4. Electroforesis

Los complejos ADN-proteína se resolvieron en geles de poliacrilamida al 5% y en 0.5X TBE. A continuación los geles se secaron y se expusieron a películas autorradiográficas a -70°C (Konica)

8. EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS DE ARN

8.1. Extracción de ARN

El ARN total procedente de 4000 células en el caso de células hematopoiéticas, o del fragmento de tejido completo en el caso de embriones (aproximadamente 2000-3000 células), se extrajo utilizando Trizol (GIBCO-BRL) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez obtenido el ARN y previamente a su utilización se trató con 5 unidades de DNasaI (Worthington) para eliminar cualquier resto de ADN genómico que pudiese interferir con la reacción de RT-PCR.

8.2. RT-PCR múltiple

Una vez tratado, el ARN total se resuspendió en 4 µl de agua y se añadió sobre una mezcla conteniendo 2.2 µl del tampón 5X (250 mM Tris-HCl pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂) (GIBCO-BRL), 0.5 µl de cada pareja de oligonucleótidos (300 ng/µl), 1 µl DTT (100mM, GIBCO-BRL), 0.5 µl dNTPs (10mM), 0.5 U/µl RNasin (Promega) y 100 unidades de MMLV-RT (GIBCO-BRL). La reacción de retrotranscripción (RT) se llevó a cabo durante una hora a 37°C en un volumen total de 11 µl. Para la primera ronda de PCR se añadieron 40 µl de una mezcla conteniendo tampón de PCR 1X (Takara Bio Inc), 1 mM de dNTPs y 1.25 U de Taq. Para la segunda ronda se utilizaron alícuotas de 1 µl de la primera, que se amplificaron individualmente utilizando

oligonucleótidos internos. Ambas reacciones transcurrieron durante 35 ciclos, con una temperatura de anillamiento de 60°C. Como control interno de la reacción los oligonucleótidos se diseñaron de tal forma que pertenecen a dos exones distintos, de modo que cuando se amplifica ADN genómico la banda correspondiente es mayor que cuando se amplifica ARNm debido a la presencia de un intrón. Las secuencias de todos los cebadores están indicadas en la tabla 2.

Gen		Oligonucleótidos	Tamaño (pb)
HPRT	1ª ronda	5'-GGGGGCTATAAGTTCTTTGC 5'-TCCAACACTTCGAGAGGTCC	313
	2ª ronda	5'-GTTCTTTGCTGACCTGCTGG 5'-TGGGGCTGACTGCTTAACC	247
β-globina	1ª ronda	5'-AGACCTATCCTCTGCCTCTG 5'-CCACTCCAGCCACCA(GC)CTTC	274
	2ª ronda	5'-A(AG)(AG)GT(GC)AAGGCCCATGGGCAA 5'-CA(CG)CTTCTG(CG)(AC)AGGCAGCCT	224
MPO	1ª ronda	5'-CGCTTCTCCTTCTTCACTGG 5'-CTGCCATTGTCTTGGAATCG	306
	2ª ronda	5'-ACTGGCCTCAACTGCGAGAC 5'-GTGTATTGACAGCCAGCAGC	272
EpoR	1ª ronda	5'-CGCTACACCTTCGCTGTTTCG 5'-CAAACCTCGCTCTCTGGGCTT	237
	2ª ronda	5'-TCTGGAGTGCCTGGTCTGAG 5'-GCTCTCTGGGCTTGGGATGC	178
miogenina	1ª ronda	5'-AATGCAACTCCCACAGCGCC 5'-GGCACTCATGTCTCTCAAACGG	568
	2ª ronda	5'-CTGGAGTTCCGTCCCAACCC 5'-TTCTGGACATCAGGACAGCC	252
Myf5	1ª ronda	5'-ATGCCATCCGCTACATTGAGAGCC 5'-TAGATAAGTCTGGAGCTGGAGGG	379
	2ª ronda	5'-GAGGGAACAGGTGGAGAACTATTA 5'-CCGGGGTAGCAGGCTGTGAGTTG	317
MEF2A	1ª ronda	5'-CAGTACGCTAGCACTGACATGG 5'-TCCGACAAAGGATTAGGGCTGG	292
	2ª ronda	5'-TAACGAGCCTCATGAAAGCAGG 5'-GACATTGAGAAGTTCTGAGGTGG	207
Six1	1ª ronda	5'-GTGGAGGCCGAGAACTTCGC 5'-CAGAGGAGAGAGTTGATTCTGC	342
	2ª ronda	5'-TGCGCCGAAAATTCCTGTTGCC 5'-TATTGTTTTCGGTGTTCTCC	249

Tabla 2. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados como cebadores en las reacciones de RT-PCR. La columna de la derecha indica el tamaño de los productos esperados.

8.3. RT-PCR múltiple en células individuales

Las células fueron depositadas en placas de 96 pocillos conteniendo 4 μ l de tampón de lisis (0.4% NP-40, 60 μ M dNTPs, 25 μ M DTT y 0.5 U/ μ l RNasin (Promega) y se lisaron durante 15 minutos en hielo. Los lisados celulares se retro-transcribieron usando múltiples pares de cebadores (15 ng/ μ l de cada pareja) y 48 U MMLV-RT por reacción, en el tampón suministrado por el fabricante (GIBCO-BRL). Para la primera ronda de PCR se añadieron 40 μ l de tampón de PCR 1X, y 1.25 U de Taq (Takara Bio Inc) y las condiciones de la PCR fueron las mismas que en el apartado anterior. Para la segunda ronda de PCR se utilizaron alícuotas de 1 μ l de la primera, que se amplificaron individualmente utilizando oligonucleótidos internos. Los cebadores utilizados están indicados en la tabla 2.

9. GENERACIÓN DE LÍNEAS ESTABLES

Las células C2C12 se transfectaron utilizando lipofectamina del mismo modo que para los ensayos de transfecciones transitorias. 24 horas antes de la transfección se plaquearon 6.2×10^5 células por placa de 90 mm en medio con 10 % de SFT. Al día siguiente se transfectaron 4.5 μ g de cada plásmido reportero linearizado (fragmento NotI-KpnI de las diferentes construcciones -4.2myo), junto con 1.5 μ g del fragmento ClaI-BamHI del vector pREP 7.

Después de 5 horas de incubación con la mezcla de ADN y liposomas, las células se lavaron y se dejaron recuperar en medio de cultivo. 36 horas después se añadió el antibiótico higromicina a una concentración de 400 μ g/ml durante 10 días, tras los cuales se pasó a una concentración de 200 μ g/ml. Para realizar estos experimentos no se seleccionaron clones individuales, y se trabajó con el conjunto de células resistentes a higromicina, ya que inicialmente comprobamos que durante el proceso de formación de clones individuales se seleccionaban principalmente clones que habían perdido su capacidad de diferenciación.

Cuando las células alcanzaron confluencia, se indujo su diferenciación mediante el cambio a medio con un 2 % de SC (sin higromicina) durante 5-7 días.

10. MAPEO CON DNasa I y ENSAYOS DE ACCESIBILIDAD A ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

10.1. Extracción de núcleos

Las células se lavaron y se recogieron en PBS frío. A continuación se resuspendieron en 1 ml de tampón A por placa de 90 mm (0.34 M sucrosa, 10 mM HEPES pH 8, 60 mM KCl, 2 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 1.5 mM DTT, 0.5 mM espermina, 0.15 mM espermidina), al que se añadió un 0.5% NP-40. Las muestras se centrifugaron a 4000 r.p.m durante 5 minutos a 4°C, se lavaron en tampón A (sin NP-40), y se centrifugaron de nuevo.

10.2. Digestión de núcleos con DNasa I

Para la digestión con DNasa I, se partió de 5 placas de células C2C12 diferenciadas por experimento y los núcleos se resuspendieron en un volumen total de 1 ml de tampón B (10 mM HEPES pH 8, 20 mM KCl, 3mM MgCl₂ y 6 mM CaCl₂). Alícuotas iguales de 200 µl se añadieron sobre 0, 0.5, 1, 2 y 3 U DNasa I (Worthington) en 100 µl de tampón B y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 minuto. La reacción se paró añadiendo EDTA a una concentración final de 16 mM en hielo, y a continuación se trataron la muestras con proteinasa K (PK) (0.67 mg/ml) y SDS (0.67%) durante al menos 4 horas a 37°C. El ADN se extrajo con fenol:cloroformo y se precipitó con etanol, tras lo cual se incubó con 0.125 mg/ml de RNasa A (en presencia de 0.1 M de acetato sódico) durante 45 minutos a 37°C. Una vez eliminado el ARN contaminante, las muestras se extrajeron de nuevo con fenol:cloroformo, y se precipitaron con etanol.

10.3. Digestión de núcleos con enzimas de restricción

Para los experimentos de accesibilidad a enzimas de restricción, 6.5×10^6 núcleos se resuspendieron en 200 µl del tampón correspondiente a cada una de las enzimas y se añadieron sobre 200 U de DraI o BanI, o 100 U de AflIII, respectivamente, en 100 µl del tampón correspondiente 1X (NE Biolabs). A continuación se incubaron a 37°C durante una hora y se paró la reacción añadiendo EDTA a una concentración 10 mM. El tratamiento con RNasa A se realizó directamente sobre los núcleos con 0.125 mg/ml de enzima en presencia de 0.1 M de acetato sódico, durante 45 minutos a 37°C. La

incubación con PK y SDS, y la extracción de ADN con fenol:cloroformo y posterior precipitación se realizaron como se menciona arriba.

10.4. Southern blot e hibridación de las membranas

25 µg de ADN se digirieron con las enzimas de restricción indicadas para cada experimento durante al menos 6 horas. A continuación las muestras se precipitaron y se resolvieron en geles de agarosa al 0.8 %. La transferencia a membranas de nylon (Maximum Strength Nytran 0.2 µm de Scheicher & Shuell) se realizó en presencia de 0.4 M de NaOH utilizando un TurboBlotter para transferencias alcalinas y neutras (S&S) siguiendo las indicaciones del fabricante. El ADN se fijó en la membrana mediante irradiación con 1200 mJ/cm² de luz ultravioleta en un UV Stratalinker 2400 de Stratagene.

Las sondas se marcaron con ³²P-dCTP (Amersham) y se purificaron mediante cromatografía de exclusión molecular en columnas tipo G-25 de Amersham Pharmacia Biotech. Las membranas se hibridaron siguiendo el método descrito por Church y Gilbert (Church and Gilbert, 1984). Previamente las membranas se prehibridaron durante 45 minutos en la solución de hibridación (0.25 M de fosfato sódico pH 7.2, 1 % SDS y 1 mM EDTA) a 60°C, tras lo cual se hibridaron con la sonda desnaturalizada durante al menos 16 horas a 60°C. Posteriormente las membranas se lavaron con la solución de lavado (20 mM fosfato sódico pH 7.2 y 1 % SDS).

Para detectar las señales radiactivas se expusieron las membranas a películas autorradiográficas (Konica)

RESULTADOS

RESULTADOS

1. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS MADRE HEMATOPOIÉTICAS

Un buen sistema para estudiar el papel que juega la metilación del ADN en la formación de sitios de cromatina activa durante el desarrollo son las células madre hematopoiéticas (HSC). Dichas células aparecen después de la ola de metilación *de novo* del genoma, y por tanto después de que el patrón de metilación haya sido finalmente establecido. Por otra parte, tanto el aislamiento como la caracterización de distintas poblaciones con capacidad de reconstituir un sistema hematopoiético han sido previamente descritos (revisado en Weissman et al., 2001).

Para la realización de este trabajo optamos por aislar la población descrita por Osawa y cols. (Osawa et al., 1996) Dichas células proceden de médula ósea de ratones adultos y son linaje negativas para marcadores de células B, T, granulocitos, monocitos y macrófagos, eritrocitos, etc, y positivas para el receptor tirosin kinasa c-kit y para la molécula de la superfamilia de las inmunoglobulinas ligadas a fosfatidilinositol, Sca-1. Esta población lin⁻, c-kit⁺, Sca-1⁺ contiene células madre muy primitivas, con capacidad de reconstitución a largo plazo.

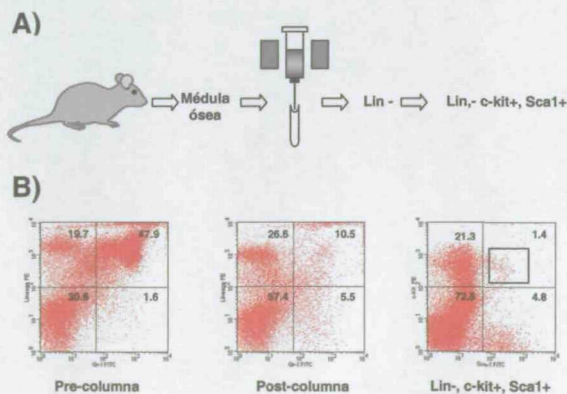


Fig. 1. Aislamiento de células madre hematopoiéticas. A) Esquema de aislamiento de células lin⁻, c-kit⁺, Sca-1⁺ a partir de médula ósea de ratones adultos. La población se enriqueció en células lin⁻

tras la incubación con anticuerpos anti-CD5, anti CD45R, anti-CD11b, anti-Gr1 y anti-Ter119 unidos a esferas magnéticas, y posterior paso por una columna de separación magnética. Las células lin- se incubaron con anticuerpos para c-kit y Sca 1 unidos a PE y FITC respectivamente y se aislaron por FACS las células doblemente positivas para ambos marcadores. **B)** Análisis por FACS de las distintas fases del proceso de purificación. Los paneles de la izquierda y del medio muestran células incubadas con anti-CD5, anti CD45R, anti-CD11b y anti-Ter119 unidos a PE y anti-Gr1 unido a FITC, antes y después de su paso por la columna de separación magnética. El panel de la derecha muestra la población final c-kit+, Sca 1+, que representa un 1.4% de las células lin-, y un 0.05-0.08% de la población inicial.

En la figura 1.A se resume el proceso de obtención de dichas células. Brevemente, células de médula ósea de ratones adultos se aislaron y se incubaron con anticuerpos biotinilados para células T (anti-CD5), B (anti-CD45-R), monocitos (anti-CD11b), granulocitos (Gr-1 y 7-4) y eritrocitos (Ter-119). A continuación se incubaron con anticuerpos anti-biotina:anti-dextrano, los cuales se unieron a su vez a complejos magnéticos. Tras su paso por una columna de separación magnética la población enriquecida en células lin-, que corresponde a un 5 % de las células nucleadas iniciales se incubó con anticuerpos que reconocen c-kit y Sca-1 unidos respectivamente a PE y FITC. Las células positivas para ambos marcadores (entre el 0.05-0.08% de las células nucleadas iniciales) se aislaron por FACS. El análisis de cada una de estas poblaciones se muestra en la figura 1.B.

Estudios recientes en células hematopoiéticas con capacidad multipotencial revelan que dichas células coexpresan varios genes necesarios para la determinación de diferentes linajes (Brady et al., 1995; Cheng et al., 1996; Hu et al., 1997). Al mismo tiempo, las regiones reguladoras de genes como mieloperoxidasa (MPO), β -globina, la cadena pesada de las inmunoglobulinas (IgH), o el receptor de eritropoietina (EpoR) parecen ser simultáneamente accesibles en líneas hematopoiéticas con capacidad multipotencial (revisado en Cross and Enver, 1997). Es decir, las HSC están preactivadas para varios, si no todos, los linajes hematopoiéticos antes de su diferenciación definitiva. Para comprobar si esto es así en la población utilizada en nuestros experimentos, realizamos ensayos de RT-PCR múltiple en células individuales. Para ellos se depositaron células lin-, c-kit+, Sca-1+ aisladas por FACS en placas multipocillo de tal forma que en cada pocillo sólo hubiese una célula. Como control negativo los pocillos 2 a 5 de cada gel no contienen ninguna célula, mientras que los cuatro siguientes contienen 10 células cada uno (controles positivos). El pocillo 1



cada caso corresponde al marcador de peso molecular. En la figura 2 se muestra un experimento representativo de RT-PCR múltiple utilizando cebadores específicos para los genes de β -globina, mieloperoxidasa (MPO), el receptor de eritropoietina (EpoR) y el gen constitutivo hidroxifosforribosil transferasa (HPRT). La media de dos experimentos independientes indica que el 42.6 % de las células HPRT+ expresan β -globina, el 61.6 % expresan MPO y el 9.3 % expresan EpoR. Al mismo tiempo el 22.3 % coexpresan β -globina y MPO, el 4.6 % coexpresan β -globina y EpoR y el 0.6 % expresan los 3 genes analizados simultáneamente. Este patrón es similar al obtenido en células lin-, CD34+ procedentes de médulas óseas de ratones adultos (Hu et al., 1997).

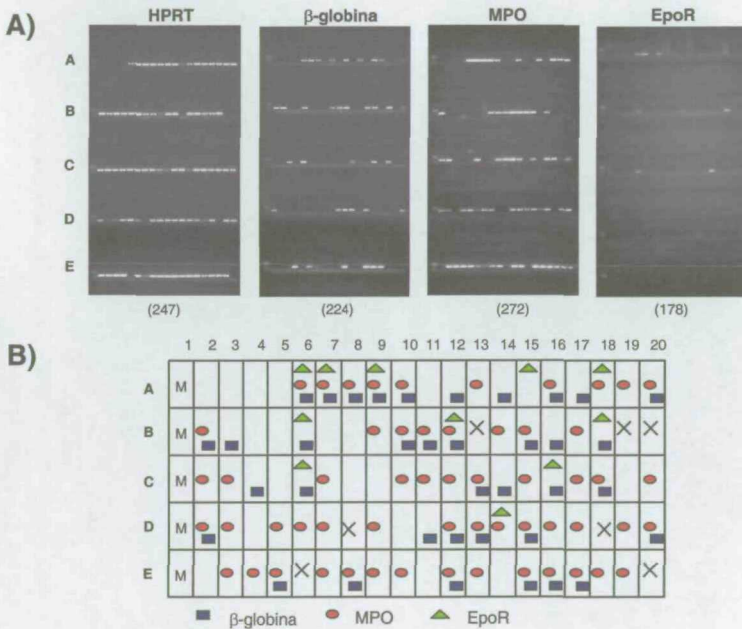


Fig. 2. Las células lin-, c-kit+, Sca-1+ están preactivadas para distintos linajes hematopoiéticos. A) Las células se depositaron en pocillos individuales, conteniendo 4 μ l de tampón de lisis, y se analizaron mediante dos rondas de RT-PCR múltiple utilizando oligonucleótidos específicos para HPRT, β -globina, MPO y EpoR. El primer carril en cada caso corresponde al marcador de peso molecular. Los carriles 2 a 5 de la fila superior corresponden a pocillos que no contienen ninguna célula y se utilizaron como control negativo, mientras que los cuatro siguientes corresponden a pocillos que

contienen diez células (controles positivos). El resto contiene una célula cada uno. El tamaño de los distintos productos se indica entre paréntesis debajo de cada panel, y la presencia de una banda de mayor tamaño en algunos de los pocillos refleja contaminación con ADN genómico. **B)** Esquema del experimento anterior en el que se resume la coexpresión de β -globina, MPO y EpoR en células individuales. Los pocillos marcados con una X no expresan HPRT. M: marcador de peso molecular.

2. LAS REGIONES REGULADORAS DE GENES HEMATOPOIÉTICOS SE ACTIVAN DESDE UN ESTADO NO METILADO EN CÉLULAS *lin⁻*, *c-kit⁺*, *Sca-1⁺*

Para empezar a estudiar si la metilación del ADN juega un papel en restringir la expresión génica durante el desarrollo, decidimos analizar el estado de metilación de una serie de promotores hematopoiéticos en HSC, así como en células diferenciadas de distintos linajes.

Para ello se eligieron regiones reguladoras de distintos genes, todas ellas con una densidad baja de CpGs y se utilizó el método de secuenciación genómica de ADN tratado con bisulfito (Frommer et al., 1992). El tratamiento con bisulfito sódico provoca la deaminación de citosinas a uracilo en ADN de cadena simple, mientras que las citosinas metiladas (5-mC) permanecen fundamentalmente no reactivas al tratamiento. A continuación, la región a investigar se amplifica mediante PCR utilizando oligonucleótidos específicos para el ADN modificado, y los productos de PCR se secuencian. De esta forma, mientras que las citosinas no metiladas aparecen como timidinas en la secuencia final, las bases modificadas en el ADN de partida permanecen como citosinas.

2.1. *Enhancer* intrónico de IgH

Los genes de las inmunoglobulinas recombinan en células productoras de anticuerpos de forma específica de tipo celular y estadio de desarrollo.

El *enhancer* intrónico ($E\mu$) de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (IgH), situado entre los segmentos J_H y la fracción constante $C\mu$, ha sido implicado tanto en el control de la recombinación de los distintos segmentos V, D y J en células pro-B como en la regulación transcripcional del gen en células B maduras (Sakai et al., 1999a; Sakai et al., 1999b). Por otra parte, ensayos de hipersensibilidad a nucleasas indicaron que el *enhancer* es hipersensible a DNasa I en linfocitos B y en distintas líneas celulares

hematopoiéticas multipotentes (FDCP A4, FDCP 1 y LyD9) (Ford et al., 1992), así como en timocitos y líneas celulares pre-T, en los cuales se ha descrito la presencia de transcripción estéril regulada por E μ (Storb et al., 1981), pero se cierra a medida que las células se diferencian. Sin embargo en células madre embrionarias (ES) y en la línea de origen pan-mesodérmico 10T1/2 el *enhancer* es inactivo y permanece en una conformación inaccesible a DNasa I. Esto sugiere que su apertura no es una característica general de todo tipo de células multipotentes sino que parece más bien exclusiva de células progenitoras hematopoiéticas.

Por otra parte algunos trabajos abordan también el estado de metilación de la región 5' del *enhancer*, que contiene un sitio de reconocimiento para la enzima sensible a metilación HpaII. Así, en un estudio realizado por Blackman y Koshland (Blackman and Koshland, 1985) se observó una correlación entre la diferenciación de células B, la activación del *enhancer* y la desmetilación de dicha citosina. Ford y cols., demuestran además que dicha citosina permanece metilada en todas las líneas hematopoiéticas multipotentes analizadas, y sólo aparece desmetilada en células pre-B y pre-T. Sin embargo, ambos trabajos presentan las desventajas de trabajar con líneas celulares, donde el patrón de metilación puede haberse visto alterado (Antequera et al., 1990), y de analizar citosinas situadas fuera de la zona de unión de los distintos factores de transcripción.

En la figura 3.A se representa el locus de IgH de ratón (desde el segmento DQ52 hasta C μ) y un esquema ampliado del *enhancer*, donde se indican los sitios de unión para los diferentes factores de transcripción y la posición relativa de los 4 CpGs que contiene. En 3.B se analizan los datos de metilación del *enhancer* intrónico de IgH en distintas células hematopoiéticas diferenciadas así como en células lin-, c-kit+, Sca-1+. Como se observa, dicha región está completamente desmetilada en el 100% de los clones analizados (18/18) en células madre hematopoiéticas, así como en células B (células B220+) (6/6). Por otro lado en células MEL (eritroides) o células CD3+ (linfocitos T maduros) el *enhancer* está metilado en las cuatro citosinas que flanquean los sitios de unión de factores de transcripción.

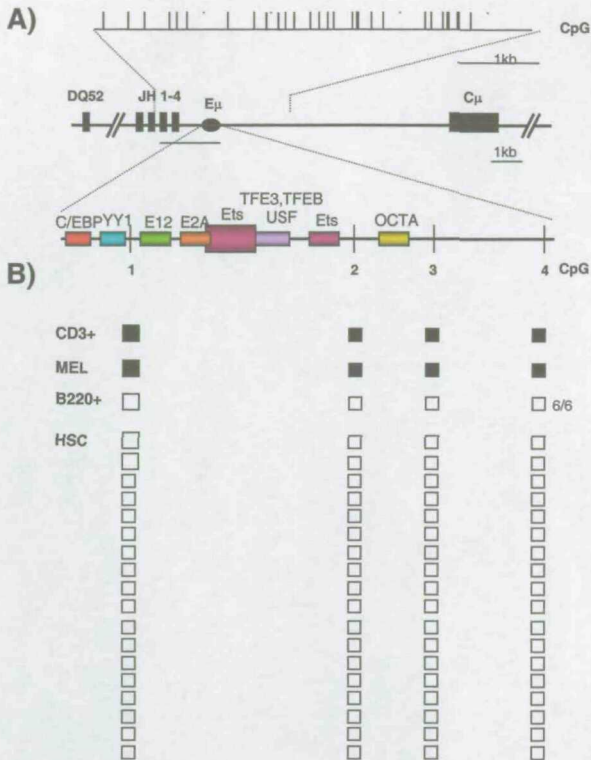


Fig. 3. El enhancer intrónico de IgH se activa desde un estado desmetilado en células lin-, c-kit+, Sca-1+. A) Esquema del locus de IgH de ratón (entre las regiones DQ52 y Cμ), en el que se destaca el enhancer intrónico Eμ y se indican los sitios de unión para factores de transcripción. Las líneas verticales indican la posición de los cuatro CpGs que contiene (CpG 1-4). En la parte superior se representa el mapa de densidad de CpGs correspondiente a la región indicada. B) Análisis por bisulfito del estado de metilación del enhancer en linfocitos T (CD3+) células MEL, linfocitos B (B220+) y células lin-, c-kit+, Sca-1+. Los cuadrados blancos representan citosinas sin metilar mientras que los negros indican citosinas modificadas. Los datos indicados para células MEL, CD3+ y B220+ corresponden a la secuenciación directa de los productos de PCR de dos experimentos independientes, y el resultado en linfocitos B se confirmó mediante el clonaje y secuenciación de 6 clones. En el caso de

células madre hematopoiéticas los datos representan el estado de metilación de 18 clones procedentes de dos tratamientos independientes.

2.2. Enhancer de la mieloperoxidasa (MPO)

La MPO es una proteína con función bactericida que se expresa exclusivamente en el estadio promielocítico de la diferenciación de células hematopoiéticas a granulocitos. En 1994 se describió un *enhancer* en la región 5' reguladora del gen, entre las posiciones -3.4 a -3.1 kb. Dicho *enhancer* es activo y accesible a nucleasas en células WEHI 3BD+, que expresan MPO, mientras que se encuentra en un estado inactivo en linfocitos B y T (Zhu et al., 1994). En células multipotentes FDCEP A4 el *enhancer*, a pesar de ser todavía transcripcionalmente inactivo, sí es hipersensible a DNasa I (Ford et al., 1996).

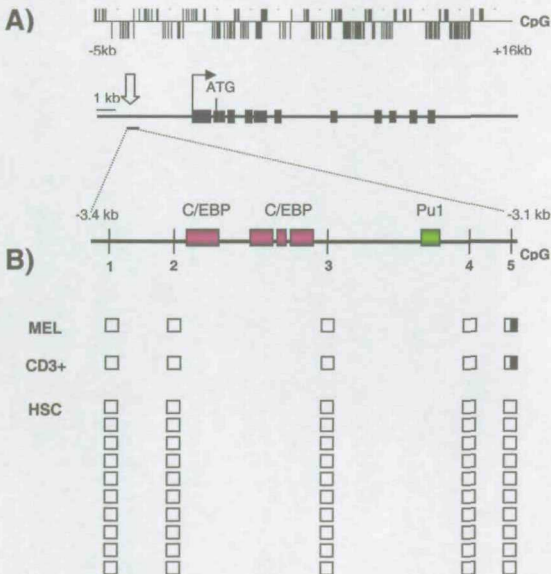


Fig. 4. El enhancer distal de MPO se activa desde un estado desmetilado en células lin-, c-kit+, Sca-1+. A) Esquema del gen de MPO de ratón en el que se destaca el *enhancer* situado entre -3.4 y -3.1 kb y se indican los sitios de unión para factores de transcripción. Las líneas verticales indican la posición de los cinco CpGs que contiene (CpG 1-5). En la parte superior se representa el mapa de densidad de CpGs del locus completo. B) Análisis por bisulfito del estado de metilación del *enhancer* en células MEL, linfocitos T (CD3+) y células lin-, c-kit+, Sca-1+. Los cuadrados blancos representan de

nuevo citosinas sin metilar mientras que los negros indican citosinas modificadas. Los datos indicados para células MEL y CD3+ corresponden a la secuenciación directa de los productos de PCR de dos experimentos independientes, mientras que en el caso de células madre hematopoiéticas los datos representan el estado de metilación de 10 clones procedentes de dos tratamientos independientes.

En la figura 4.A se representa un esquema del gen de MPO de ratón y se destaca el *enhancer* mencionado anteriormente. Como se observa en la figura 4.B, en células lin-, c-kit+, Sca-1+, esta secuencia se encuentra desmetilada en todos los clones analizados (10/10), lo que indicaría que el *enhancer* se activa inicialmente desde un estado no modificado. Sin embargo, al analizar el estado de metilación en células diferenciadas que no expresan MPO, como la línea celular MEL, o linfocitos T, se vio que en estas células el *enhancer* también se encuentra desmetilado, con excepción de la citosina situada en posición más 3', que está parcialmente metilada. Estos datos indicarían que a pesar de que el gen se activa desde un estado desmetilado en HSC, esta modificación no juega ningún papel en la restricción de la expresión del gen en otros tipos celulares, al menos en células de sangre.

2.3. El promotor del receptor de eritropoietina (EpoR)

La eritropoietina (Epo) es el principal regulador de la diferenciación de células hematopoiéticas a eritrocitos. Esta glicoproteína ejerce su acción a través de la unión al receptor de superficie EpoR. La expresión de dicho receptor, al igual que la de muchos genes relacionados con el proceso de eritropoiesis, depende principalmente de tres factores de transcripción: GATA-1, Sp1 y proteínas de unión al motivo CACCC, como EKLF (Raich and Romeo, 1993; Youssoufian, 1994). Al igual que sucedía con los *enhancers* de IgH y MPO, se han mapeado varios sitios de hipersensibilidad a DNAsas a lo largo del gen y de su región 5' reguladora, uno de los cuales corresponde al promotor mínimo del gen. Dicho promotor es accesible tanto en células hematopoiéticas multipotentes como en células eritroides y su grado de apertura depende del nivel de expresión del gen (Heberlein et al., 1992; Youssoufian, 1994). Por otra parte, se han detectado transcritos de EpoR en distintas poblaciones mutipotentes, tanto hematopoiéticas como embrionarias, aunque la expresión es mucho menor que en células diferenciadas. Con el desarrollo de técnicas de análisis de expresión en células individuales, se ha podido comprobar que sólo un pequeño porcentaje de células dentro

de las poblaciones multipotentes expresan el gen (entre el 8 y 10 % en el caso de HSC procedentes de médula ósea de ratones adultos (Hu et al., 1997 y figura 2 de esta tesis).

En la figura 5 se representa el promotor de EpoR (5.A), y se analiza su estado de metilación en distintas células hematopoiéticas (5.B). Como se puede observar, dicho promotor está casi completamente metilado en linfocitos B y T maduros, mientras que está desmetilado en una línea celular regulada por eritropoietina. En HSC el patrón de metilación es variable, con un 24 % de los clones desmetilados en las citosinas que rodean a las secuencias CACCC, GATA-1 y Sp1 (CpG 4, 5, 6, 8, 9, 10), exceptuando la que se incluye en el sitio de unión de Sp1 (CpG 7). Sin embargo, se ha demostrado que la metilación del sitio Sp1 (GGGCGG) no afecta directamente a la unión de esta proteína al ADN (Holler et al., 1988).

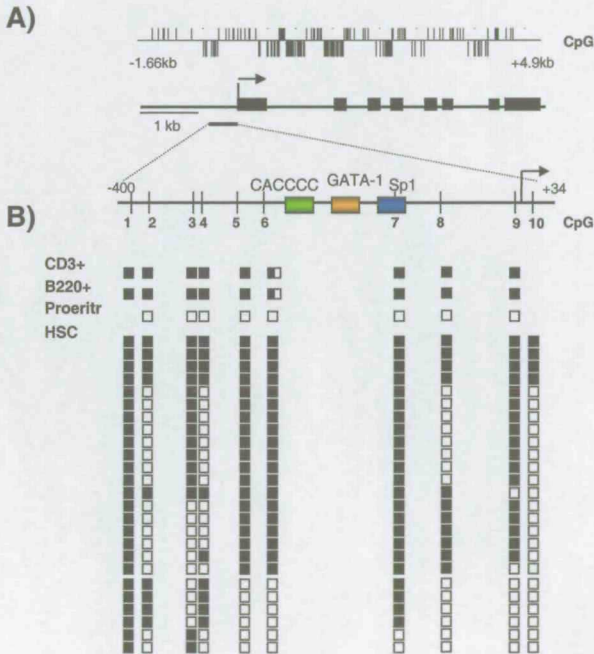


Fig. 5. El promotor de EpoR se encuentra desmetilado en el 24% de las células lin⁻, c-kit⁺, Sca-1⁺. A) Esquema del gen de EpoR de ratón en el que se destaca la región del promotor proximal y se

indican los sitios de unión para factores de transcripción. Las líneas verticales indican la posición de los nueve CpGs que contiene (CpG 1-9). En la parte superior se indica la densidad de CpGs del locus completo. **B)** Análisis por bisulfito del estado de metilación del promotor en células CD3+, B220+, proeritroblastos (ver materiales y métodos) y células lin-, c-kit+, Sca-1+. Los datos indicados para células CD3+, B220+ y proeritroblastos corresponden a la secuenciación directa de los productos de PCR de dos experimentos independientes, mientras que en el caso de células madre hematopoiéticas los datos representan el estado de metilación de 25 clones procedentes de tres tratamientos independientes.

Por tanto, y si tenemos en cuenta los datos de expresión de EpoR en HSC individuales (fig. 2), la proporción de alelos no metilados es también en este caso mayor al porcentaje de células que expresan el gen.

Hasta ahora, los datos sugieren que las HSC procedentes de ratones adultos están preactivadas para una serie de linajes hematopoiéticos, no sólo porque coexpresan genes de distintos linajes, sino porque varias de estas regiones reguladoras se activan desde un estado desmetilado dentro de la misma población, al menos en un porcentaje de células.

3. EL PROMOTOR DE MIOGENINA ESTÁ DESMETILADO EN UN 8 % DE LAS CÉLULAS MADRE HEMATOPOIÉTICAS

A continuación quisimos investigar si el mayor grado de desmetilación con respecto a expresión observado en HSC en los genes analizados es una característica exclusiva de genes hematopoiéticos, o es general a otras regiones reguladoras. Para ello decidimos analizar lo que sucedía en un gen de otro linaje.

La miogenina es una proteína necesaria para el control de la diferenciación muscular. Su gen se expresa inicialmente en las somitas más anteriores de embriones de día 8.5, y depende principalmente de tres secuencias reguladoras en su promotor: un sitio de unión para factores de la familia bHLH específicos de músculo, un sitio para factores MEF2, y un sitio mef 3 (al que se unen proteínas de la familia Six). En la figura 6.A se representa un esquema del gen, y se destaca su región promotora.

El análisis por bisulfito de este promotor mostró que las citosinas en CpGs alrededor de los sitios de unión de factores de transcripción están metiladas en células MEL (eritroides) y CD3+ (linfocitos T maduros), y generalmente no metiladas en un tejido que expresa altos niveles del gen (músculo esquelético de ratones neonatos). En HSC sin embargo, mientras que la mayoría de los clones estaban completamente metilados, sorprendentemente se detectó un pequeño porcentaje de clones (8% del total

de clones analizados), en los cuales las tres citosinas situadas antes del sitio de inicio de la transcripción estaban desmetiladas, y otro 12 % en los que al menos dos de estas citosinas estaban sin modificar (fig. 6.B).

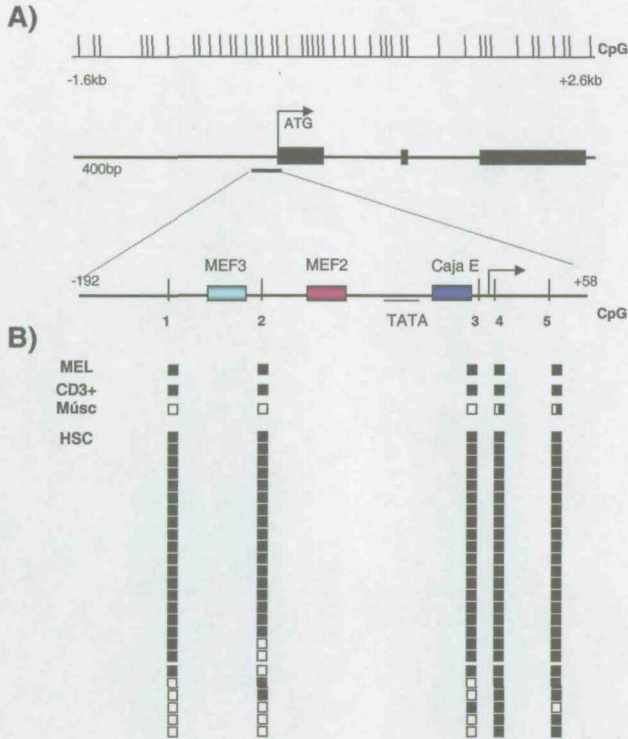


Fig. 6. El promotor de miogenina se encuentra desmetilado en el 8-12% de las células lin-, c-kit+, Sca-1+. A) Esquema del gen de miogenina de ratón en el que se destaca la región del promotor proximal y se indican los sitios de unión para factores de transcripción. Las líneas verticales indican la posición de los cinco CpGs que contiene. En la parte superior de la figura se representa la densidad de dinucleótidos CpG del gen completo. B) Análisis por bisulfito del estado de metilación del promotor en células MEL y CD3+, músculo esquelético de ratones neonatos y células lin-, c-kit+, Sca-1+. Los datos indicados para los tres primeros corresponden a la secuenciación directa de los productos de PCR de dos experimentos, mientras que en el caso de células madre hematopoiéticas los datos representan el estado de metilación de 25 clones procedentes de tres tratamientos independientes.

4. LAS CÉLULAS MADRE HEMATOPOIÉTICAS NO EXPRESAN GENES MUSCULARES

La observación de que al menos un pequeño porcentaje de células madre específicas de sangre tienen el promotor de miogenina desmetilado, nos llevó a plantearnos la posibilidad de que el gen se expresase en algunas de ellas. Para analizar esta hipótesis realizamos ensayos de RT-PCR partiendo del ARN procedente de 4000 células. Como control de la reacción utilizamos células de la línea muscular C2C12 en cantidad decreciente (4000, 400, 40 y 4 células). El número de células se mantuvo constante en todos los casos utilizando células CV-1 que no expresan miogenina. Como se observa en la figura 7, no se observó expresión de miogenina o Myf5 en HSC en condiciones capaces de detectar expresión de una célula entre 1000, mientras que el gen constitutivo HPRT se detectó en todos los casos.

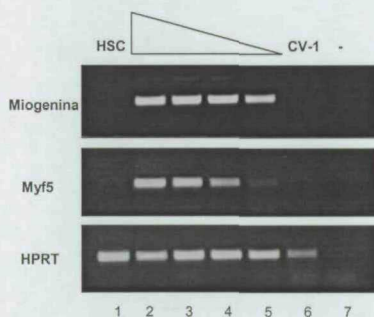


Fig. 7. Las células *lin⁻, c-kit⁺, Sca-1⁺* no expresan miogenina o Myf5. Análisis por RT-PCR múltiple de la expresión de miogenina, Myf5 y HPRT en ARN procedente de 4000 células *lin⁻, c-kit⁺, Sca-1⁺* (carril 1), ó 4000, 400, 40, 4 ó 0 células C2C12 (carriles 2 a 6). El número de células totales en todos los casos se mantuvo constante añadiendo células CV-1. El carril 7 no contiene ARN (control negativo).

5. DESMETILACIÓN DEL PROMOTOR DE MIOGENINA EN SOMITAS DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO

Con objeto de estudiar si la metilación de su promotor juega un papel en regular la expresión inicial de miogenina durante el desarrollo embrionario, decidimos analizar el grado de metilación en somitas de embriones de día 9.5 (e9.5). Para ello disponíamos de la línea de ratones transgénicos GZ1092, en la que la expresión de lacZ está bajo el control de la región 5' reguladora del gen de miogenina (Yee and Rigby, 1993). En la figura 8.A se muestran dos embriones de e9.5 teñidos con X-gal, en los que se observa un gradiente de expresión del gen antero-posterior. En esta figura se intenta representar

también la variabilidad en cuanto al estadio de somitogénesis que se puede encontrar dentro de una misma camada. Durante este proceso, las somitas se desarrollan desde el mesodermo pre-somítico con una nueva somita creándose cada 1.5-2 horas. Así, en el panel izquierdo se muestra un embrión de 23 somitas, en el que las somitas 1-8 todavía no expresan el gen. Este empieza a detectarse en la somita 9, y su expresión aumenta gradualmente en las somitas más rostrales. El embrión del panel derecho, sin embargo, se encuentra en el estadio de 27 somitas, en el cual ya se detecta expresión de miogenina a partir de la somita 3.

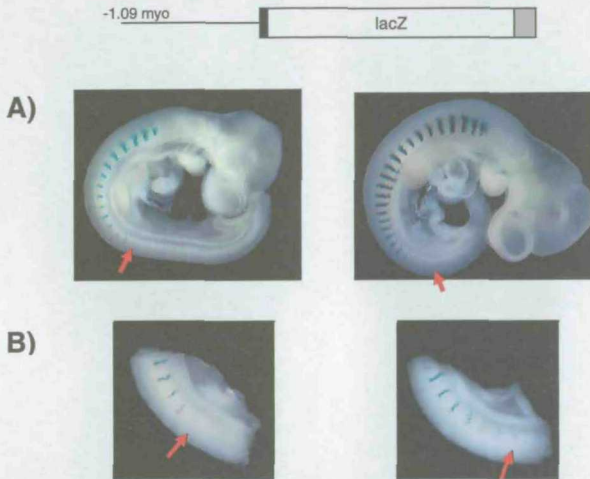


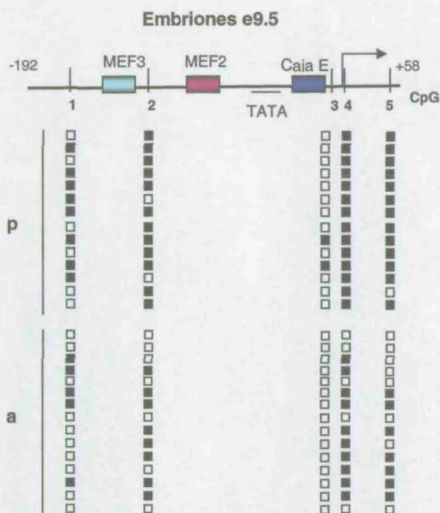
Fig. 8. Ratones transgénicos GZ1092. Esquema del transgén GZ1092 en el cual la expresión de lacZ está bajo el control de la región 5' reguladora del gen de miogenina. **A)** Embriones de e9.5 teñidos con X-gal, en los que se observa la expresión del transgén en somitas siguiendo un gradiente rostro-caudal. **B)** Somitas intermedias de embriones de e9.5. La flecha indica la somita más posterior en la que se detecta expresión de lacZ.

Para soslayar esta variabilidad en cuanto a la expresión del gen dentro de cada camada, y separar eficientemente las somitas que expresan miogenina, de las que todavía no han activado el gen, se aislaron embriones de día 9.5 (de entre 25 y 27 somitas) y tras decapitarlos y eliminar el corazón se dividieron en tres regiones: somitas

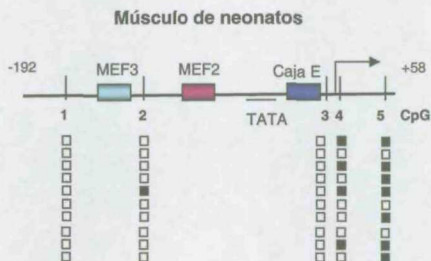
posteriores y mesodermo pre-somítico (equivalente en longitud a unas 3 somitas), somitas intermedias, y somitas anteriores. A continuación, las somitas de la región media se tiñeron con β -gal. Sólo aquellos embriones en los que al menos la somita más caudal de esta región era negativa para la tinción con β -gal (y por tanto no habían activado todavía el promotor de miogenina), se utilizaron para los siguientes experimentos. En la figura 8.B se muestra un ejemplo de la tinción de somitas intermedias de dos de los embriones utilizados.

Las somitas anteriores y posteriores fueron aisladas eliminando la mayor cantidad de mesodermo lateral y de estructuras axiales posibles, de tal forma que hasta un 30-40% del tejido aislado corresponde a células que expresan o van a expresar miogenina. En la figura 9.A se muestran los datos del análisis por bisulfito de uno de estos embriones. Como se puede observar, el promotor de miogenina se desmetila parcialmente al pasar de somitas posteriores a somitas anteriores, con excepción de la citosina situada en posición -10 (CpG 3), que permanece generalmente desmetilada en ambos casos. Un análisis más detallado de los datos muestra que esta desmetilación se corresponde generalmente con clones que han desmetilado todas las CpGs alrededor de los sitios de unión para factores de transcripción (alrededor del 40% de los clones procedentes de somitas anteriores en embriones de 25 a 27 somitas). La figura 9.B muestra los datos de metilación en tejido de músculo esquelético de ratones neonatos, que expresa cantidades elevadas del gen, y se observa que el promotor está completamente desmetilado en los tres CpG situadas antes del inicio de la transcripción. La figura 9.C resume estos datos, representados como el porcentaje de citosinas metiladas con respecto al total de clones analizados para cada experimento. La desviación estándar en el caso de somitas anteriores y posteriores de embriones de e9.5 corresponde a tres experimentos diferentes. Sin embargo, si recordamos lo que sucedía en células hematopoiéticas (fig. 6), el 100% de los sitios CpGs están metilados en células no musculares, con excepción del pequeño porcentaje de clones que permanecen sin metilar en HSC.

A)



B)



C)

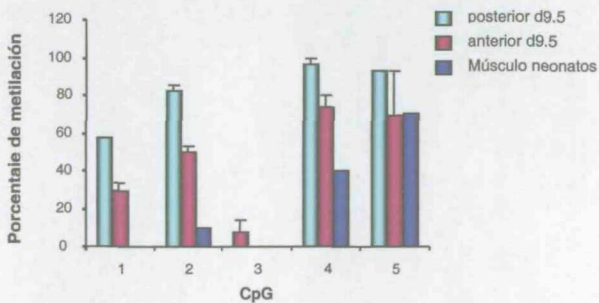


Fig. 9. Desmetilación del promotor de miogenina en somitas anteriores de embriones de e9.5. Análisis por bisulfito del estado de metilación del promotor en: **A)** somitas posteriores (p) y anteriores (a) en un embrión de e9.5 y **B)** Células procedentes de músculo esquelético de ratones neonatos (lengua). **C)** Representación gráfica de los resultados, representados como el porcentaje de alelos metilados con respecto al total de clones analizados para cada citosina. La desviación estándar corresponde a tres experimentos independientes.

En esta primera parte de la tesis se ha analizado desde qué estado se activan inicialmente una serie de genes durante el desarrollo en términos de metilación de ADN. Para ello hemos utilizado dos sistemas distintos: activación de genes específicos de sangre en células madre hematopoiéticas procedentes de ratones adultos, y activación del gen de miogenina durante la somitogénesis en embriones. En el primer caso hemos observado una correlación entre la preactivación previamente descrita para una serie de linajes hematopoiéticos y una desmetilación de las regiones reguladoras de los genes correspondientes. Además, en el caso del *enhancer* intrónico de IgH o del promotor de EpoR, estas regiones se mantienen desmetiladas tras la diferenciación de las células madre hacia linfocitos B o eritrocitos respectivamente, mientras que se remetilán en células que diferencian a otros linajes. En el caso de la activación inicial del gen de miogenina durante el desarrollo, observamos una desmetilación del promotor a medida que las somitas empiezan a expresar el gen. Así, el grado de metilación en somitas posteriores es mayor que en somitas anteriores, y la desmetilación de los CpGs que rodean los sitios de unión de los factores de transcripción es completa en músculo esquelético de ratones neonatos.

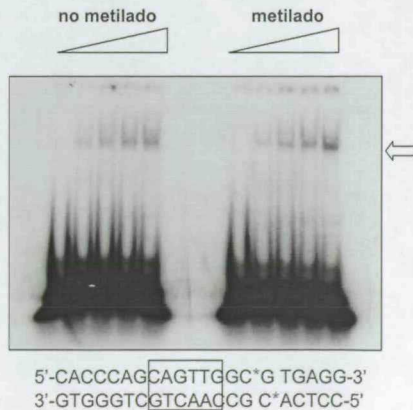
6. PROTEÍNAS DE LA FAMILIA bHLH SE UNEN A LA CAJA E PROXIMAL DEL PROMOTOR DE MIOGENINA INDEPENDIENTEMENTE DEL ESTADO DE METILACIÓN DEL CpG ADYACENTE

En el análisis del estado de metilación del promotor de miogenina durante el proceso de somitogénesis observamos que tanto en somitas anteriores como posteriores el dinucleótido CpG situado junto a la caja E proximal se encontraba desmetilado en casi todos los clones analizados. Ésta parece ser una característica de células con potencial miogénico, ya que no se observa en células madre hematopoiéticas o linfocitos T (fig. 6.B) y nos llevó a preguntarnos si la desmetilación de esta citosina en concreto podría jugar un papel directo en la activación del gen. Para analizar esta

cuestión decidimos estudiar si la unión de factores específicos de músculo a esta secuencia del promotor se veía afectada por la presencia de un grupo metilo en esta citosina. Existen varios casos de factores de transcripción como CTCF (Bell and Felsenfeld, 2000; Hark et al., 2000) o AP-2 (Comb and Goodman, 1990) cuya unión al ADN se ve directamente afectada por la metilación de su secuencia de reconocimiento mientras que en otros casos la unión es independiente del estado de metilación del ADN, como sucede con Sp1 (Holler et al., 1988). Sin embargo, recientemente se ha descrito que la metilación de CpGs fuera del sitio de unión de Sp1 en el promotor de p21 es capaz de reducir la unión de Sp1/Sp3 (Zhu et al., 2003).

En la figura 10 se muestra un experimento de retardo en gel utilizando oligonucleótidos para la secuencia de esta caja E proximal del promotor de miogenina y cantidades crecientes de extractos nucleares de células C2C12 diferenciadas. En el panel de la izquierda la citosina marcada con una estrella está sin metilar, mientras que en el de la derecha, el oligonucleótido fue sintetizado incluyendo 5me-citosina en esa posición. Como se observa, la unión de proteínas nucleares de células musculares a esta secuencia es igual tanto si la citosina ha sido metilada como si se encuentra sin modificar. Esto nos sugiere que la metilación de la citosina en posición -10 no inhibe directamente la unión de proteínas a la caja E proximal del promotor. Que esta secuencia se mantenga desmetilada en células con potencial miogénico por algún otro motivo permanece por investigar.

Fig. 10. Proteínas nucleares de células C2C12 diferenciadas se unen a la caja E proximal del promotor de miogenina independientemente del estado de metilación del CpG adyacente. Experimento de retardo en gel utilizando cantidades crecientes (1, 3, 5 y 7 µg) de extractos nucleares de células C2C12 diferenciadas. Como oligonucleótido se utilizó el fragmento del promotor de miogenina (-24/-4) que contiene la caja E proximal a la cual se unen factores de la familia bHLH. En el panel de la izquierda



el CpG adyacente e indicado con un asterisco se encuentra sin metilar, mientras que en el panel de la derecha el oligonucleótido se sintetizó incorporando 5-meC en esa posición.

7. LAS SOMITAS POSTERIORES DE EMBRIONES DE e9.5 NO EXPRESAN MIOGENINA A PESAR DE TENER LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN NECESARIOS

Con objeto de profundizar en el estudio de los mecanismos que reprimen la expresión de miogenina en el mesodermo presomítico y somitas recién sintetizadas, decidimos analizar el patrón de expresión de los distintos factores de transcripción que se unen a su promotor. Para ello realizamos ensayos de RT-PCR múltiple en somitas anteriores y posteriores de embriones de e9.5 utilizando como cebadores oligonucleótidos para miogenina, Myf5, MEF2A, Six 1 y el gen constitutivo HPRT. Como se observa en la figura 11, en somitas posteriores que todavía no expresan miogenina, ya están presentes al menos algunos de los factores de las familias de bHLH, MEF2 y Six. La falta de expresión de miogenina en somitas posteriores podría ser debida a que una célula dada no expresa suficientes de estos factores. Por otro lado, la expresión del gen podría depender absolutamente de la presencia de un factor en concreto.



Fig. 11. Las somitas posteriores de embriones de e9.5 contienen factores de las familias bHLH, MEF2 y Six, pero no expresan miogenina. Ensayo de RT-PCR múltiple en somitas anteriores (carril 1) y posteriores (carril 2) de embriones de e9.5, utilizando oligonucleótidos específicos para miogenina, Myf5, MEF2A, Six1 y HPRT. En el carril 3 no se añadió retrotranscriptasa a la reacción de RT-PCR, mientras que el carril 4 no contiene ARN (controles negativos). El tamaño de cada banda en pb viene indicado entre paréntesis.

8. EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE MYF5, MEF2A Y SIX 1 EN SOMITAS ANTERIORES Y POSTERIORES DE EMBRIONES DE e9.5

El análisis por RT-PCR múltiple utilizado inicialmente, a pesar de darnos una idea de la expresión de los distintos factores en somitas, tiene la desventaja de no ser

cuantitativo. Sabemos que la expresión inicial de genes durante el desarrollo depende de la existencia de un balance adecuado de los factores necesarios para su activación, así como de distintas señales extracelulares. Para comprender mejor cual es el balance de estos factores en células precursoras de músculo, decidimos analizar el número de células que coexpresan Myf5, MEF2A y Six1 en somitas anteriores y posteriores. Las somitas de embriones de e9.5 se diseccionaron y el tejido resultante fue disgregado. Las células vivas se depositaron de placas de 96 pocillos por FACS y se analizó la expresión de los distintos genes en cada célula mediante RT-PCR múltiple. Los pocillos 2 a 5 de cada gel no contienen ninguna célula (controles negativos), el sexto contiene 100 células, y los tres siguientes 10 (controles positivos). El primer pocillo corresponde al marcador de peso molecular y el resto contienen una célula cada uno.

En la figura 12 se muestra un experimento representativo de RT-PCR sobre estas células. Los paneles de la parte superior corresponden a la expresión de miogenina, Myf5, Six1 y MEF2A en somitas anteriores, mientras que los paneles de la parte inferior muestran el número de células que coexpresan estos factores en somitas posteriores. Como se puede apreciar, la expresión de MEF2A es generalmente ubicua en todas las células aisladas, mientras que el número de células que coexpresan MEF2A y Six1 oscila entre un 30 y un 45 % (dependiendo del experimento), tanto en somitas anteriores como posteriores. Este número coincide con la proporción de tejido aislado que realmente corresponde a precursores de células musculares que expresan o van a expresar miogenina. La mayor diferencia que encontramos está en la expresión de Myf5. Éste empieza a detectarse en somitas posteriores en embriones de e9.5, pero el número real de células que expresan el factor es muy bajo y sólo se detecta en los pocillos que contienen 100 células. En estas condiciones la expresión de miogenina todavía no es detectable (la presencia de una banda de mayor tamaño en algunos de los carriles indica contaminación con ADN genómico).

En somitas anteriores, sin embargo, a pesar de que la proporción de células que coexpresan MEF2A y Six 1 es comparable a la observada en somitas posteriores, Myf5 se detecta en un 10% de células individuales. En este caso, la expresión de miogenina depende absolutamente de la presencia de Myf5, ya que sólo se observa en células que expresan este factor. Esto no es sorprendente, ya que se ha descrito que la expresión de miogenina depende necesariamente de factores de la familia bHLH, y que Myf5 es el único de esta familia presente en estas células en el momento de activación de miogenina (Ott et al., 1991).

La segunda observación surgida de estos experimentos, es que el número de células aisladas de somitas anteriores que expresan miogenina (aproximadamente un 10%) es sistemáticamente menor del estimado cuando realizamos las disecciones, y que calculábamos en alrededor de un 30-40%. Esta observación, junto con los datos de metilación en somitas anteriores de embriones de e9.5 (donde aproximadamente el 40% de los clones están completamente desmetilados en las 3 citosinas anteriores al inicio de la transcripción) sugiere que la desmetilación del promotor es previa a la activación del gen. Sin embargo, el hecho de no poder analizar lo que sucede en la misma célula tanto a nivel de expresión como de estado de metilación del promotor hace que sea imposible confirmar esta hipótesis.

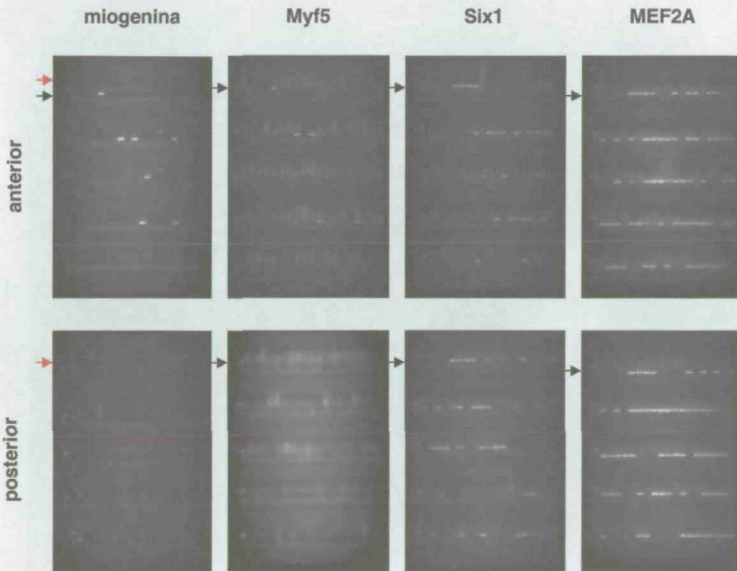


Fig. 12. Expresión diferencial de Myf5, MEF2A y Six1 en somitas. Análisis por RT-PCR múltiple de la expresión de miogenina, Myf5, Six1 y MEF2A en células individuales de somitas anteriores (paneles superiores) o posteriores (paneles inferiores) de embriones de e9.5. El primer carril en cada caso corresponde al marcador de peso molecular. Los cuatro pocillos siguientes en la fila superior de cada panel no contienen ninguna célula, mientras que el sexto contiene 100 y los tres siguientes 10 cada uno. El tamaño de cada banda (indicado con una flecha negra) es el mismo que en la fig. 11, y la

presencia de una banda de mayor tamaño indica contaminación con ADN genómico (indicado con una flecha roja).

9. MYF5, MEF2A Y SIX 1 NO SON CAPACES DE ACTIVAR EL PROMOTOR DE MIOGENINA METILADO EN ENSAYOS DE TRANSFECCIONES TRANSITORIAS

Los efectos de la metilación del ADN en la expresión génica no están del todo claros. La represión causada por dicha modificación depende de un balance entre la densidad de CpGs metiladas, la fuerza de la unión de las proteínas de unión a ADN metilado (MBDs) y la presencia de factores de transcripción específicos de tejido. Así los promotores que contienen islas CpGs están desmetilados en todos los tejidos del organismo (exceptuando los promotores asociados con el cromosoma X que ha sido inactivado, y los de algunos genes que se inactivan por *imprinting*). La metilación de estos promotores da lugar a la unión estable de proteínas de unión a ADN metilado, lo que conduce a una fuerte represión de estas regiones. Sin embargo, en el caso de regiones reguladoras con una densidad baja de CpGs, la unión de MBDs es más débil y por tanto más fácilmente desplazable. En estas regiones la presencia de un *enhancer* fuerte como el del virus SV40 es capaz de anular el efecto represor de la metilación del ADN (Boyes and Bird, 1992).

Relacionado con esta observación, el segundo objetivo general de esta tesis fue estudiar si es posible activar secuencias reguladoras desde un estado metilado cuando todos los factores de transcripción necesarios se encuentran presentes y en las cantidades adecuadas.

Para ello se realizaron en primer lugar ensayos de transcripción transitoria en los que se utilizó la región 5' reguladora del gen de miogenina de ratón, unida al gen de la luciferasa. Esta construcción fue metilada *in vitro*, utilizando la enzima bacteriana Sss1 y se transfectó en células CV-1, junto con vectores de expresión para Myf 5, MEF2A y Six1. Las células CV-1, a pesar de no contener factores de las familias bHLH o MEF2 endógenos, son capaces de iniciar el programa miogénico en respuesta a la transfección con dichas proteínas (Kaushal et al., 1994). Como se ve en la figura 13, los tres factores son capaces de activar el promotor de miogenina en células CV-1 cuando el promotor no está metilado. Además se observó un efecto aditivo entre ellos y la activación es máxima en células cotransfectadas con los tres. Sin embargo, tras la metilación del

promotor lo primero que observamos es una disminución en la actividad basal de unas 5 veces. En este caso, la cotransfección con los distintos factores de transcripción, aunque recupera parcialmente la actividad del promotor metilado, no consigue alcanzar en ningún caso la actividad obtenida con el promotor sin metilar.

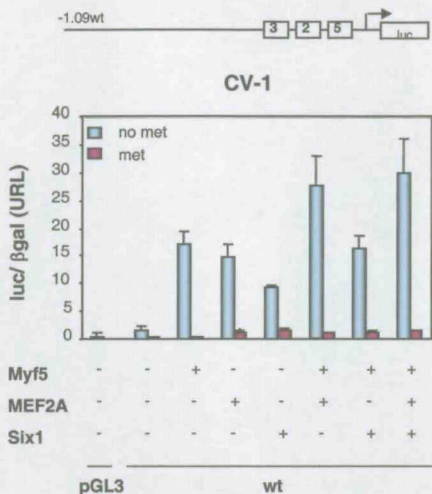


Fig. 13. Efecto de la metilación en la activación del promotor en ensayos de transfecciones transitorias en células CV-1. Las células CV-1 fueron transfectadas con 2.5 µg de una construcción del promotor de miogenina (-1.09wt) fusionada al gen de luciferasa sin metilar o metilada con Sss1 y 2.5 µg de vectores de expresión para Myf5, MEF2A y Six1. Las cajas indicadas como 3, 2 y 5 en el promotor indican los sitios de unión mef3 (al que se unen proteínas de la familia Six), mef2 y la caja E proximal (que une Myf5) respectivamente. 24 horas después de la transfección las células se incubaron durante 48 horas en medio de cultivo conteniendo 2% de suero de caballo. Los datos vienen representados como unidades de actividad luciferasa relativa (URL) normalizadas con respecto a la actividad β-galactosidasa de cada extracto.

Para descartar que este efecto fuese debido a que las células CV-1 careciesen de otros factores específicos de células musculares, se utilizó la línea celular C2C12, procedente de mioblastos de ratón. El proceso de diferenciación de mioblastos a miotubos viene acompañado de una serie de cambios en las células. El más llamativo de todos es un cambio morfológico. Las células C2C12 sin diferenciar son mioblastos de

morfología poligonal, capaces de dividirse indefinidamente (fig. 14.A). Sin embargo, cuando las células alcanzan confluencia, se pone en marcha el proceso de diferenciación y los mioblastos se fusionan entre sí para dar lugar a fibras alargadas multinucleares denominadas miotubos (fig. 14.B) Esta diferenciación se ve estimulada en medio bajo en suero (2% de suero de caballo), aunque las señales exactas responsables de este proceso no se conocen completamente. A nivel molecular, este proceso viene iniciado por la activación de una serie de genes de diferenciación, uno de los cuales es miogenina.

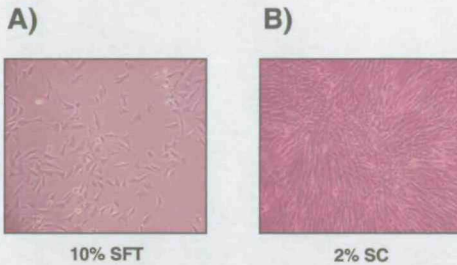


Fig. 14. Diferenciación de células C2C12 en respuesta a bajo suero. A) Mioblastos proliferando en medio de crecimiento (10% SFT). B) Células diferenciadas a miotubos tras 48 horas en medio de diferenciación (2% SC).

El fragmento del promotor de miogenina unido al gen de la luciferasa (metilado o sin metilar) se transfectó en células C2C12 y la actividad luciferasa se midió a las 48 horas de inducir la diferenciación de las células. Como se ve en la figura 15, la construcción metilada del promotor tampoco es activa en células musculares. También comprobamos que la mutación de los tres sitios de unión de factores de transcripción situados en el promotor mínimo, a pesar de reducir drásticamente la actividad de la construcción no metilada, no es capaz de abolirla completamente. Esta observación está de acuerdo con datos que indican que aunque la secuencia comprendida entre -133 y +5 es suficiente para una correcta activación espacio-temporal del gen durante el desarrollo, las secuencias situadas entre -1092 y -133 son necesarias para alcanzar niveles adecuados de expresión en ratón (Yee and Rigby, 1993).

En resumen estos experimentos indican que no es posible activar la transcripción desde el promotor de miogenina metilado en ensayos de transfecciones transitorias, incluso aunque los factores de transcripción adecuados estén presentes.

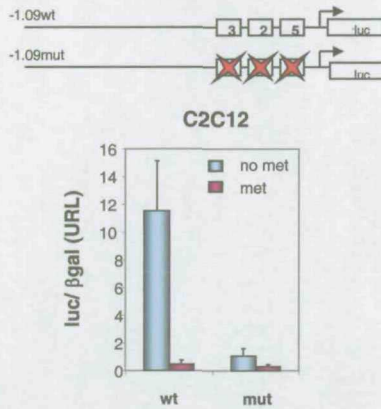
Sin embargo, estos experimentos tienen una serie de desventajas: en primer lugar se utilizaron plásmidos metilados *in vitro* con la enzima SssI. Esta enzima metila

todas las citosinas en dinucleótidos CpG, mientras que la densidad media de CpGs metiladas en ratón es de 60-70%. Además, SssI metila también la secuencia del gen de la luciferasa y el vector, con un alto contenido en CpGs. Por tanto, la densidad de citosinas metiladas es mayor de la que encontraríamos en el gen endógeno. Por otro lado, en nuestros experimentos el plásmido introducido es incapaz de replicarse, excluyendo un posible mecanismo de desmetilación pasiva previo a la transcripción del gen.

Por todo esto decidimos analizar la cuestión utilizando un abordaje distinto, que reprodujese más fielmente lo que sucede *in vivo* en las células.

Fig. 15. Efecto de la metilación en la activación del promotor en ensayos de transfecciones transitorias en células C2C12.

Las células C2C12 se transfectaron con 2.5 μ g de la construcción silvestre del promotor de miogenina (-1.09wt), o con una construcción en la que se mutaron todos los sitios de unión para factores de transcripción situados en el promotor proximal (-1.09mut), sin metilar o metiladas con SssI. 24 horas después de la transfección se indujo la diferenciación de las células mediante el cambio a medio bajo en suero y se incubaron durante otras 48 horas. Los datos vienen representados como unidades de actividad luciferasa relativa (URL) normalizadas con respecto a la actividad β -galactosidasa de cada extracto.



10. NUEVA APROXIMACIÓN: ENSAYOS DE ACCESIBILIDAD AL PROMOTOR DE MIOGENINA EN CÉLULAS C2C12 TRANSFECTADAS ESTABLEMENTE

Como se menciona en la introducción de esta tesis el ADN en el interior de una célula eucariota está altamente empaquetado en cromatina. Para que la mayoría de los procesos nucleares como la transcripción puedan ocurrir, es necesario que esta estructura se desorganice, al menos parcialmente.

Las zonas reguladoras (promotores y *enhancers*) de genes que están siendo expresados suelen asociarse con sitios de hipersensibilidad a nucleasas (HS). Éstas son regiones que carecen de nucleosomas convencionales (revisado en Gross and Garrard, 1988) y son más sensibles a DNasa I y otras nucleasas que el resto del gen. La formación de un HS depende de la unión de factores de transcripción específicos de tejido (Boyes and Felsenfeld, 1996; Stamatoyannopoulos et al., 1995) siendo éste un fenómeno de todo o nada. Es decir, la mutación de los distintos sitios de unión para factores de transcripción disminuye aditivamente el número de células capaces de formar un sitio de HS.

Para estudiar si la metilación de ADN juega algún papel en la formación de HS se diseñó el siguiente sistema experimental. Construcciones del gen de miogenina (fragmento EcoRV conteniendo las secuencias comprendidas entre -4.2 y +1.5) fueron metiladas *in vitro* utilizando Sss1 y se transfectaron establemente en mioblastos C2C12. A continuación se diferenciaron las células a miotubos, y tras 6 días en medio de diferenciación (DMEM suplementado con 2% de suero de caballo), se extrajeron los núcleos, y se analizó la accesibilidad de las distintas construcciones del promotor a enzimas de restricción. Un esquema de esta aproximación está representado en la figura 16. Sin embargo, para que estos experimentos sean válidos es necesario analizar en primer lugar si el promotor de miogenina adopta una estructura sensible a nucleasas en células que expresan el gen.

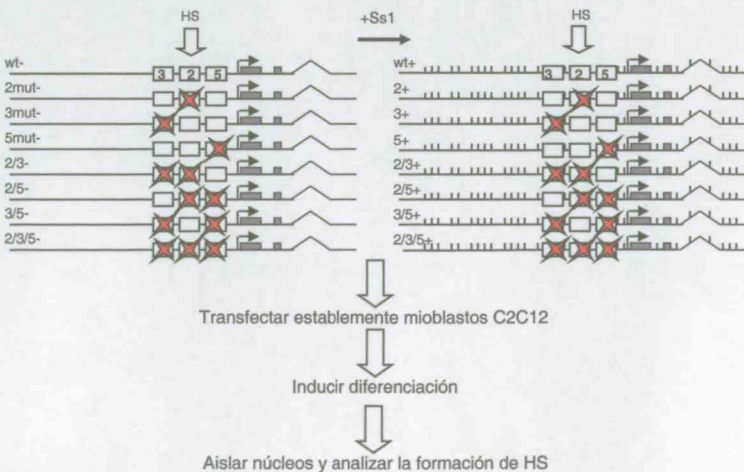


Fig. 16. Esquema de la generación de líneas establemente transfectadas con el gen de miogenina. Construcciones conteniendo las secuencias comprendidas entre -4.2 y +1.5 kb del gen, donde los sitios de unión para Myf5 (5), MEF2A (2) y Six1 (3) del promotor se mutaron solos o en todas las posibles combinaciones fueron metilados *in vitro* utilizando la enzima Sss1. A continuación, se cotransfectaron en células C2C12 junto con un vector de expresión de resistencia a higromicina y se seleccionaron células establemente transfectadas con dicho antibiótico. Las células se diferenciaron y se midió el porcentaje de accesibilidad a enzimas de restricción de las distintas construcciones.

11. EL PROMOTOR DE MIOGENINA ES SENSIBLE A DNasa I Y ACCESIBLE A ENZIMAS DE RESTRICCIÓN EN CÉLULAS C2C12 DIFERENCIADAS

Con objeto de estudiar si la activación de miogenina viene acompañada de una estructura de la cromatina “abierta” alrededor de su promotor, decidimos realizar un mapeo de DNasaI a lo largo del gen, utilizando núcleos de células C2C12 diferenciadas. Para ello las células se cultivaron en un medio bajo en suero durante un período de 72 horas, tras el cual se extrajeron los núcleos y se incubaron en presencia de cantidades crecientes de DNasa I. Esta enzima digiere ADN que no está recubierto por nucleosomas con más facilidad (uno o dos órdenes de magnitud más) que el resto del genoma. A continuación se extrajo el ADN genómico, se cortó con enzimas flanqueantes y se analizó por *Southern blot*. La figura 17.B muestra un experimento representativo de este mapeo, en el que se pueden distinguir al menos dos sitios hipersensibles a DNasas a lo largo del gen. El primero (HS1) corresponde al promotor de miogenina que, como era de esperar, es hipersensible en células que han activado el gen. El segundo (HS2) está situado en el extremos más 5' del primer intrón, y no se corresponde con ninguna secuencia reguladora descrita hasta el momento para este gen. En algunos experimentos fuimos capaces de detectar también un tercer HS (HS3), situado en el extremo mas 3' del primer intrón. En la figura 17.A se muestra un esquema del gen, en el que se indica la posición de los distintos sitios de hipersensibilidad.

Para confirmar estos datos, y al mismo tiempo comprobar si el posible HS3 es realmente una zona que carece de nucleosomas convencionales utilizamos enzimas de restricción para digerir los núcleos. Las enzimas de restricción no son capaces de cortar si su secuencia de reconocimiento está recubierta por un nucleosoma. Además, si se

utilizan en exceso tienen la ventaja de dar una medida cuantitativa de la cantidad de ADN digerido en una secuencia concreta. Al contrario de lo que sucede cuando se utiliza ADN desnudo la digestión nunca es del 100% cuando se realiza sobre ADN empaquetado en cromatina y suele alcanzar un máximo que oscila entre el 35-50 % dependiendo de la sensibilidad del HS.

Para nuestros experimentos iniciales elegimos dos enzimas distintas. La primera (AflIII) corta una única vez en el promotor de miogenina, en posición -138, mientras que la segunda (BanI) corta tres veces a lo largo de la secuencia del gen: una en el promotor proximal (en posición -25) y otras dos en el primer intrón (en +1462 y +2605). Los experimentos se realizaron de nuevo sobre núcleos de células C2C12 diferenciadas durante 72 horas, y utilizando un exceso de enzima. La sonda utilizada (myo1) fue la misma que en la figura 17.B. En la figura 17.C podemos comprobar que tanto AflIII como BanI son capaces de cortar en el promotor, y ésta última es también accesible a las dos secuencias de reconocimiento situadas en el intrón 1. Esto confirma que los tres sitios identificados mediante el mapeo con DNaseI se encuentran en una estructura de cromatina más accesible que el resto del gen.

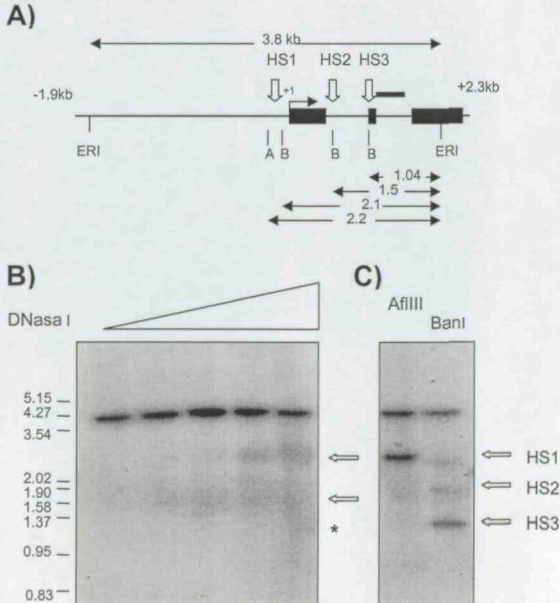


Fig. 17. El promotor de miogenina es hipersensible en células C2C12 diferenciadas. A)

Esquema del gen entre las secuencias -1.9kb y +2.3kb, en el que se indican la posición de los tres exones (cajas negras), así como de los tres sitios de hipersensibilidad encontrados. La sonda utilizada (myo1) está indicada como una barra horizontal en la parte superior (segundo intrón), y los sitios de corte para EcoRI (ERI), AflIII (A) y BanI (B) están señalados en la parte inferior. **B)** Núcleos de células C2C12 diferenciadas durante 48 horas se incubaron con cantidades crecientes de DNasaI. El ADN se extrajo y 25 µg se digirieron con EcoRI. A continuación las muestras se resolvieron en un gel al 0.9% de agarosa, se transfirieron y se hibridaron con una sonda correspondiente a la región del gen entre +1122 y +1480. Los sitios HS1 y HS2 están indicados con flechas, mientras que un posible HS3 viene indicado con un asterisco. **C)** Núcleos de células C2C12 diferenciadas durante 48 horas se incubaron con 100 unidades de AflIII ó 200 unidades de BanI durante una hora. A continuación se extrajo al ADN y se analizó como en el apartado anterior. Los tres sitios HS vienen indicados con flechas.

La observación de que el promotor de miogenina se encontraba en una zona de hipersensibilidad a DNasas en células C1C12 no es sorprendente ya que, como hemos visto, las zonas reguladoras de genes transcripcionalmente activos suelen presentar una estructura más “abierta” de la cromatina. Sin embargo, en nuestro mapeo inicial a lo largo del gen hemos detectado también otros dos sitios de hipersensibilidad situados en el primer intrón, que no corresponden con secuencias reguladoras previamente descritas de este gen. Aunque el estudio de los sitios HS2 y HS3 está fuera de los objetivos de esta tesis, decidimos realizar un estudio comparativo de las secuencias de dicho intrón en varias especies. Al mismo tiempo analizamos también si existen posibles sitios de unión para factores de transcripción específicos de músculo en dicha secuencia.

Como se observa en la figura 18, la secuencia de la región 5' del intrón 1 del gen está altamente conservada en ratón, rata y humanos, lo que apoya la hipótesis de un posible papel regulador de esta región. Al mismo tiempo, se han detectado tres posibles cajas E a lo largo de esta secuencia en el gen de ratón. La primera de ellas está conservada además en rata y humanos, mientras que la segunda sólo se conserva completamente en rata en la misma posición. La última de ellas, a pesar de encontrarse solamente en ratón, está situada solapando con el sitio de corte de BanI en HS3, lo que explicaría la aparición de este sitio de hipersensibilidad en células C2C12. Sin embargo, para analizar si estos sitios son importantes en la regulación del gen, sería necesario realizar experimentos de transactivación con las secuencias correspondientes.

```

ratón      -----CAGCCC---ATG
rata      -----GGCGGGGCGGGCCCGAGCCG---GTG
humano    CGGGGCGGGGCGGGCCCGAGCCAGGGGTAAGTGGCCATCCATCCCCTGCCCCAAGGG
          * * *

ratón      TTAAGTGGCTAGTACA---CCAGATCCA---GGGATAGGGCCAGAGGGAGGTGCCTGGGT
rata      TTAAGTGGCTAGTGCA---CCAGTTCCA---GGGATAGAGCCAGAGGGAGGTGCCTGGTC
humano    TTAAGTGGCCATCCATCCCCTGCCCAAGGGGACGGGCGCAGAGGGAGGCACTGGAC
          * * * * *

          Caja #1
ratón      AGCCCCGGGCCACCA-----GAGCTAGAACAGGTGCAAGACAGGGCCCTTGG
rata      AGCCTCGGGCCACCA-----GAGCTAGAACAGGTGCAAGACAGGACCTTGA
humano    AGCCTCAAGACCCCAAGAGGGGCTCAGAGGGTTGGAGCAGGTGCCAGACAGGGTCG-AGG
          * * * * *

ratón      GATCCCTGGACCCCTTTCTTGTGG--CTAGACTGTCCAGT-GGCCTTCTGGGCTC-AT
rata      GATCCCGAGACCCCTTTCTTGTGG--CTAGAGTGTCCAGC-GGCCTTCTGTATC-AT
humano    GGCTGCAGGAGCCCTTCCCTGGTCAGAGCTGGGCTATCCAGCTGACCTCCTGTGTCTGT
          * * * * *

          Caja #2
ratón      ACTGTTTCCA-----AAATCAGATGGGGTAGGGTGGAGTGA
rata      ACTGTTTCCAGACACAGAAAGGCAGTGAATAT-AAATCAGATGGGGTGGGTGGATTG
humano    GTTCTTTCCAGACAAGATAAAGGCAGTGGGAGGAAGTGCAGAGGGGTTGGGGTG--G
          * * * * *

ratón      GCACAGGAGAACAGAAAGGGGCCGAAACAAGCCTGCAGTAAG---GGCTTTGGTGAG-
rata      GCACAAGGGAACAGAAAGAGACCCAGAAACAAGCCTGAAGTAAG---GGCTTAGGAGAG-
humano    GAACATAGGACTGAAGAAAGATCAGGAGCCAGGCCACAGTCAGCCAGGTGAGGGTGAGG
          * * * * *

ratón      -----CTAGGT-----GAAATGAGGGAAGGTGGCCTAAGAAACCT
rata      -----CTAGGT-----GAAATGAGA-AAAAGTGCCCAAGAAACCC
humano    ATTAATCCAGTGCGTGAAGTGCAGAGCCTAAAGGCCAGGCAAGTTACACAGAGAGACT
          * * * * *

ratón      GCTTTGTCC-AA----GTCCAGGC---TTCATTTTGGACCTGACCAACACATTAGAA
rata      GCTTTATCCCA---AGCCATAGCC---TCTATTTTGGAGCTAACAAACACATTAGAA
humano    GCTTTGCCCCATCTCGGTGTGGCTGAGCAGAGAGAAACCCACTCAGTCTCATTTGAA
          * * * * *

ratón      TGGCCACAGGCCTGCTCAG---GAGC--CACCGTAACAAAATACTGTGGTTTATCACCT
rata      TGTCCATAGGCCCGGCTCAG---GAGC--CACCATACAAAATACTGTGGTTTACACCT
humano    CTCCAGAGGCCTGCAACAAGCGAAGCTTCACTGGGCCCAAAAATCTGTCTCATCACCT
          * * * * *

ratón      CACCGCCGAATGAAAGCAAGTTCTCATCTAGAGCTAGGAAGACCTAGAAGTAGGA
rata      TATCCCTAAATTAAGGCAAAATTCATCCTAGAGCTAGGAAGACCTAGAATATGA
humano    TATGCCAGAGTCAAGAGAACAGGGGACCCCTTTAGTCT-GGTGTCTGTGAGAGCAAA
          * * * * *

ratón      TGCTAT-----GTAACATTCTGCG---TAGAC--TTGACC-TTG-GACCTTGGGCTT
rata      TGACTAC-----GTAACATTCTATG---TGAGTAAGTACGAC-CTGTAAACCGAGCAGA
humano    CCACACCCAGGATGGAAGCCAGGAAGGCTGGAGCAGGGGCTCTGGGTGTGAGAGGA
          * * * * *

          Caja #3
ratón      GTCTTGCATGCAGGTGCG-CAGT-GAATGCAACTC---CC-ACAGCGCC-TCCTGCA--
rata      GAGAAATACCTGAGACCTTAGT-AGACTTGACCTTGACC-TTGGCTTGTCTTGCATG
humano    GCTAGTTACAAAGATTCTAGGGTGGGGATGGCTGGGCTGGAAGGCCACAGCTGTGGC
          * * * * *

```

Fig. 18. Análisis comparativo de las secuencias del primer intrón del gen de miogenina en ratón, rata y humanos. Los alineamientos se llevaron a cabo con el programa Clustal X. Los nucleótidos conservados en las tres especies se han indicado con asteriscos rojos, y en azul y negrita se indican la posición de tres posibles cajas E en la secuencia de ratón. Las secuencias correspondientes a los sitios de reconocimiento de BanI están señaladas en cursiva y subrayadas.

12. LA METILACIÓN DEL PROMOTOR DE MIOGENINA DISMINUYE LA PROBABILIDAD DE FORMACIÓN DEL SITIO DE HIPERSENSIBILIDAD HS1

A continuación pasamos a estudiar el posible papel que pueden jugar la metilación del promotor de miogenina y los distintos factores de transcripción en la formación del HS1. Para ello fragmentos del gen sin metilar o metilados con Sss1 se introdujeron establemente en células C2C12. Además de la línea que contenía la construcción silvestre, se generaron líneas que contenían mutaciones en los sitios de unión de los distintos factores de transcripción, en todas las posibles combinaciones. De esta forma pretendíamos analizar además el papel que juegan dichos factores en la generación de cromatina activa, y comparar lo que sucede cuando el ADN está metilado o sin metilar. Para generar cada una de estas líneas las células se cotransfectaron con las distintas construcciones junto con el gen de resistencia a higromicina, y se seleccionaron con dicho antibiótico durante al menos dos semanas. Inicialmente los experimentos se intentaron realizar sobre clones individuales para cada una de las construcciones. Sin embargo, el mismo proceso de aislamiento de clones seleccionaba a su vez células con menor capacidad de diferenciación, que no eran capaces de formar el sitio de hipersensibilidad en el promotor del gen endógeno. Por este motivo, los siguientes experimentos se realizaron utilizando conjuntos de células.

Las células establemente transfectadas se diferenciaron en medio bajo en suero y se recogieron a los 6 días. Los núcleos se aislaron y los ensayos de accesibilidad a enzimas de restricción se realizaron como en el apartado anterior, utilizando en este caso 200 unidades de la enzima DraI por cada 6.5×10^5 núcleos. Se comprobó previamente que esta cantidad de enzima era suficiente para que la digestión del promotor endógeno alcanzase un máximo en 1 hora de incubación (datos no mostrados).

En la figura 19.A se representa un esquema del gen endógeno y del transgén silvestre, junto con los tamaños de las bandas sin digerir y digerida. Las mutaciones introducidas en las distintas construcciones son las que se indican en la figura 16. Como hemos visto antes, dichas mutaciones se introdujeron solas o en todas las posibles combinaciones, y las construcciones se transfectaron establemente sin metilar o tras metilarlas *in vitro* con Sss1.

La figura 19.B muestra un ejemplo de *Southern blot*. El panel superior fue hibridado con una sonda que sólo reconoce el transgén (β -globina), mientras que el

inferior está hibridado con una sonda para el tercer exón de miogenina (*myo2*), que sólo está contenido en el gen endógeno. La cantidad de radiactividad de cada banda se midió utilizando un PhosphorImager. El porcentaje de accesibilidad del gen endógeno representa el nivel máximo de corte para esa línea celular y experimento concretos y depende del grado de diferenciación de las células. Se calcula como (cantidad de radiactividad en la banda digerida)/(cantidad de radiactividad total) X 100, y en el caso de las células C2C12 parentales oscila entre 30-40%. Para cada experimento concreto y para cada línea celular se midió el grado de accesibilidad del promotor endógeno (panel inferior de 19.B) y se utilizó como control interno de la reacción.

En la figura 19.C se representa el porcentaje de accesibilidad relativa del promotor en cada una de las construcciones transgénicas, calculado como $[(\text{cantidad de radiactividad en la banda digerida})/(\text{cantidad de radiactividad total})]_{\text{transgén}} / [(\text{cantidad de radiactividad en la banda digerida})/(\text{cantidad de radiactividad total})]_{\text{endógeno}} \times 100$. Con estos experimentos demostramos en primer lugar que la mutación de los distintos sitios de unión para los factores de transcripción en el promotor de miogenina sin metilar disminuye, aunque con diferente potencia, la probabilidad de formar un sitio de hipersensibilidad. Esta disminución es aditiva y máxima cuando los tres sitios están mutados. Un fenómeno similar se ha observado en otras regiones reguladoras como el enhancer de la β^A/ϵ globina de pollo (Boyes and Felsenfeld, 1996). En el caso del promotor de miogenina las mutaciones de los sitios *mef2* y *mef3* disminuyen en más de un 50% la accesibilidad del promotor. Sorprendentemente la mutación de la caja E proximal por sí misma no tiene apenas ningún efecto, pero sin embargo sí que es capaz de potenciar la acción de las otras mutaciones.

La segunda cuestión que abordábamos con estos experimentos era estudiar el papel que juega la metilación de las secuencias reguladoras en la generación del sitio de hipersensibilidad. Como se ve en la figura 19.C (barras granates), la metilación del promotor disminuye la probabilidad de formar el sitio de hipersensibilidad en más de un 60% incluso aunque el promotor se encuentre intacto. En este contexto, la mutación de dos o tres de los sitios de unión para factores de transcripción anula casi completamente la capacidad de formar cromatina activa. Es decir, se necesitan más factores de transcripción para activar desde un estado metilado, aunque la activación es sólo parcial cuando las secuencias reguladoras se encuentran metiladas.

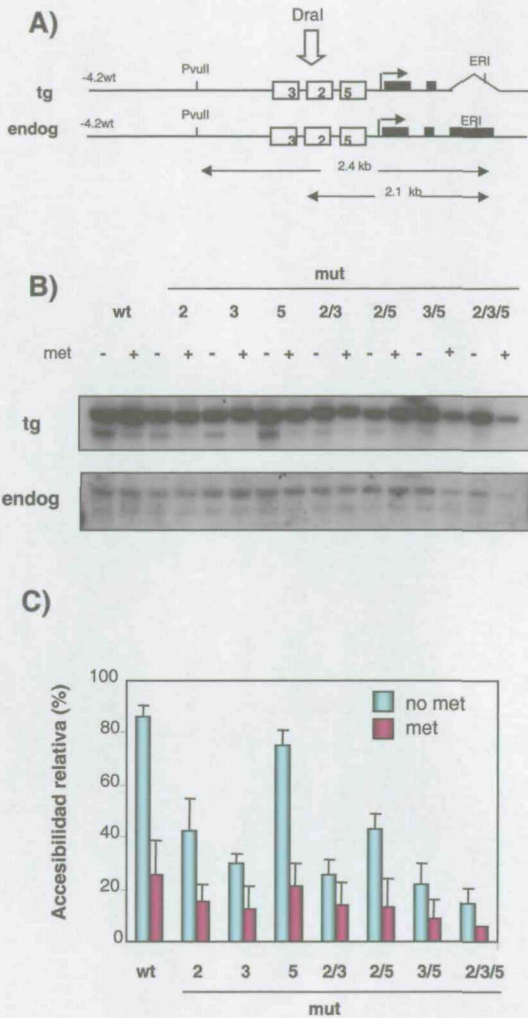


Fig. 19. Accesibilidad del promotor a enzimas de restricción. A) Esquema del gen de miogenina de ratón endógeno y del transgén silvestre (wt) introducido establemente en células C2C12. Las cajas blancas representan los sitios de unión para los factores Myf5 (5), MEF2 (2) y proteínas de la familia Six que se unen al sitio mef3 (3) en el promotor, y las cajas negras indican la posición de los tres exones. En el caso del transgén el tercer exón ha sido sustituido por la cola poliA del gen de β -globina de

pollo. Las diferentes mutaciones del transgén utilizadas son las representadas en la figura 16. Los sitios de corte de PvuII, DraI y EcoRI vienen indicados en cada caso, así como el tamaño de las bandas sin digerir y digerida. **B)** *Southern blot* en el que se analiza la accesibilidad de las distintas construcciones del promotor, sin metilar o metiladas. Núcleos de cada una de las líneas diferenciados durante 6 días se incubaron con 200 unidades de DraI durante una hora. El ADN se extrajo y se digirieron 25 µg con EcoRI y PvuII. A continuación se resolvieron las muestras en un gel de agarosa al 0.9%, se transfirieron y se hibridaron con una sonda correspondiente a secuencias del tercer exón (panel inferior). El panel superior muestra la misma membrana hibridada con una sonda correspondiente a la cola poliA del gen de β-globina (transgén). La intensidad las bandas se midió utilizando un PhosphorImager, y el porcentaje de accesibilidad para cada línea se calculó como: (cantidad de radiactividad en la banda digerida) / (cantidad de radiactividad total) X 100. **C)** Gráfica indicando la accesibilidad media de cada línea, normalizada en cada caso con respecto a la accesibilidad del gen endógeno.

13. LA METILACIÓN DEL PROMOTOR DISMINUYE EL NÚMERO DE CÉLULAS CAPACES DE FORMAR UN SITIO DE HIPERSENSIBILIDAD

Como hemos visto en el apartado anterior, la metilación de la secuencia reguladora del gen de miogenina reduce la accesibilidad a enzimas de restricción. Es decir, disminuye la probabilidad de que se forme el sitio de hipersensibilidad. Existen dos mecanismos generales que podrían explicar este comportamiento. Ambos se basan en la hipótesis de competición entre factores de transcripción y MBDs por la unión al promotor de miogenina metilado. En el primer modelo la estructura de todos los sitios de hipersensibilidad estaría alterada y por tanto más inaccesible debido a la presencia de estas MBDs compitiendo con los factores de transcripción, y la formación del HS se vería debilitada en todas las células. En este contexto, las enzimas de restricción utilizadas en los ensayos cortarían más lentamente debido al impedimento estérico, pero al final llegarían al máximo alcanzado en la construcción sin metilar.

El segundo modelo, sin embargo, se basa en la existencia de dos poblaciones de núcleos: los que contienen un sitio completamente accesible y aquellos que contienen un HS completamente inaccesible. Esto se explicaría si sólo en un porcentaje de las células el balance de factores de transcripción fuese suficiente para desplazar a las MBDs, y entonces las desplazasen completamente, mientras que en el resto fuesen estas proteínas las que se uniesen a la secuencia reguladora compactando la cromatina. En esta situación, que se ha denominado de “todo o nada”, las enzimas de restricción cortarían la construcción metilada con una cinética similar a la construcción sin metilar,

pero alcanzarían un máximo de corte menor. Este máximo reflejaría el número de núcleos en los que el promotor es accesible.

Para estudiar qué sucedía en nuestro promotor, realizamos ensayos de accesibilidad con *DraI* en núcleos de células establemente transfectadas con la construcción silvestre metilada o sin metilar a distintos tiempos. Como control interno de la reacción se utilizó de nuevo el gen endógeno. En estas condiciones analizamos tanto la cinética como el máximo de la reacción para cada línea.

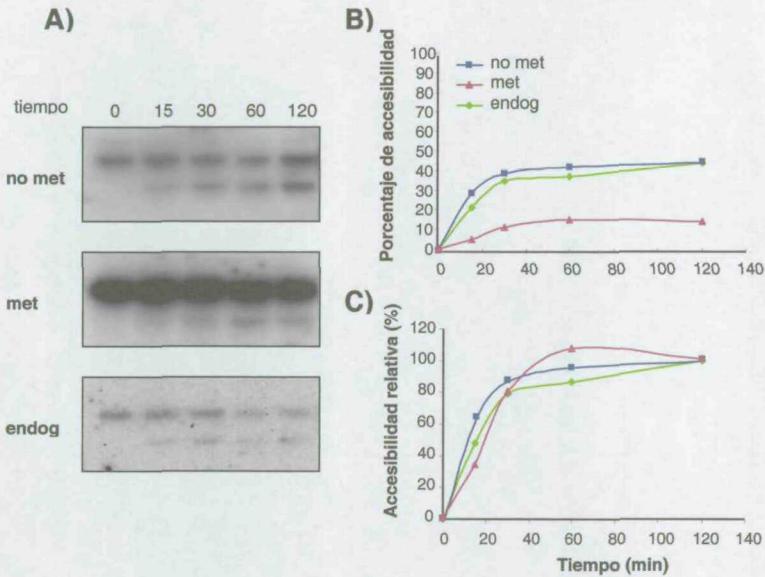


Fig. 20. Cinética de la accesibilidad de *DraI*. **A)** Núcleos de células transfectadas con la construcción silvestre sin metilar (wt-) o metilada (wt+) indicadas en la figura 19, y de células C2C12 parentales (endog) diferenciadas durante 6 días se incubaron con 200 unidades de *DraI* durante 0, 15, 30, 60 y 120 minutos, y se procesaron como en la fig. 18. Los dos primeros paneles están hibridados con la sonda correspondiente a la cola poliA del gen de β -globina, mientras que el último está hibridado con la sonda correspondiente al tercer exón de miogenina. La exposición de la película es mayor en el caso de la construcción metilada para que sea detectable la banda digerida. **B)** Gráfica en la que se representa el porcentaje de accesibilidad con respecto al tiempo de incubación con *DraI* para cada línea. **C)** Gráfica para la cual se ha considerado el máximo de accesibilidad de cada locus como el 100% y se muestra el porcentaje de accesibilidad relativa con respecto al tiempo de digestión con *DraI*.

En la figura 20.A se muestra un ejemplo de Southern blot de núcleos digeridos durante 0, 15, 30, 60 y 120 minutos con la misma cantidad de enzima, y en la figura 20.B se representa gráficamente el porcentaje de accesibilidad con respecto al tiempo para cada construcción. Como se puede apreciar tanto el promotor endógeno como el transgén sin metilar, siguen un patrón de corte similar, alcanzando un máximo de alrededor del 35-40% de corte entre 30 y 60 minutos. Por otra parte, la construcción metilada también alcanza un máximo, aunque en este caso es del alrededor al 8-12%. Para comparar las cinéticas de las distintas reacciones representamos los datos de forma que el máximo de accesibilidad para cada reacción fue considerado el 100%. La figura 20.C muestra el porcentaje de accesibilidad relativa para cada una de las construcciones y nos indica que todas siguen una cinética similar, alcanzando un 50% de corte en tan solo 10-20 minutos, y un máximo entre media y una hora.

Podemos concluir por tanto que la metilación del promotor de miogenina disminuye la probabilidad de formar el sitio de hipersensibilidad debido a que disminuye el número de células capaces de reorganizar la estructura de la cromatina alrededor de esta secuencia. En las células que se forma, el sitio es completamente accesible.

14. LAS CÉLULAS C2C12 NO SON CAPACES DE DESMETILAR EL PROMOTOR DE MIOGENINA METILADO IN VITRO EN RESPUESTA A ESTÍMULOS DE DIFERENCIACIÓN

En los últimos años ha aumentado el número de estudios demostrando que algunos activadores transcripcionales pueden promover desmetilación de ADN (Han et al., 2001; Hsieh, 1999; Kirillov et al., 1996; Matsuo et al., 1998; Saluz et al., 1988). Sin embargo, con excepción de este último que se realizó utilizando ADN integrado establemente en el genoma, todos los demás han sido realizados utilizando transfecciones transitorias, o episomas estables. Además, en la mayoría de ellos (exceptuando de nuevo algunos de los estudios realizados por Hsieh y cols.) no se utilizó la enzima Sss1 para metilar el ADN, sino combinaciones de las enzimas HpaII y HhaI. Estas enzimas metilan también citosinas en dinucleótidos CpG, pero sólo si se encuentran en el contexto CCGG y GCGC (respectivamente). Por tanto la densidad de ADN metilado obtenido tras el tratamiento con ellas es mucho menor que si se utiliza Sss1.

Por otra parte, ensayos con enzimas de restricción sensibles a metilación a lo largo del gen de miogenina de ratón han mostrado que la desmetilación de una citosina en la región 5' reguladora se correlaciona con la activación del gen en células C2C12 (Lucarelli et al., 2001). En este mismo estudio se observa que dos citosinas situadas en el primer exón permanecen metiladas durante el proceso de diferenciación. Sin embargo ninguna de estas tres citosinas está en la región del promotor mínimo analizado en nuestros experimentos, el cual observamos que se desmetila alrededor de los sitios de unión para factores de transcripción durante el proceso de miogénesis en el embrión. Nuestros datos en embriones de e9.5 indican además que el grado de desmetilación es mayor que el número de células que expresan el gen en somitas anteriores de embriones de e9.5, sugiriendo que dicha desmetilación es previa a la activación inicial del gen.

Por todo esto nos planteamos si los sitios de unión para los factores de transcripción en el promotor de miogenina juegan un papel en el proceso de desmetilación observado *in vivo*. Para ello decidimos analizar en primer lugar si la construcción silvestre metilada *in vitro* y transfectada establemente en células C2C12 se desmetila al inducir la diferenciación de las células. Núcleos de células diferenciadas durante 5 ó 7 días fueron aislados como en el apartado anterior y se comprobó que las células habían diferenciado a miotubos siguiendo dos criterios: la adquisición de una morfología tubular, como la que se muestra en la fig. 14.B, y accesibilidad a DraI del promotor endógeno (véase fig. 19.B panel inferior). Una vez comprobado que las células habían diferenciado propiamente, se extrajo el ADN genómico de dichos núcleos y se analizó mediante tratamiento con bisulfito sódico. Como se ve en la figura 21, no observamos desmetilación significativa a lo largo del promotor en la construcción transgénica, incluso después de 7 días en medio bajo en suero.

Existen varias formas de explicar este resultado, aparentemente contradictorio con lo que observamos *in vivo*. En primer lugar, el grado de metilación del gen tras el tratamiento con SssI es mayor que el observado en somitas posteriores de embriones de e9.5. Sabemos que la represión causada por la metilación de ADN depende de la densidad de citosinas metiladas, y que existe un umbral a partir del cual la represión es estable y difícilmente se puede contrarrestar (Boyes and Bird, 1992). Por otro lado, la línea celular utilizada, contiene un elevado número de copias del transgén metilado, el cual está además integrado establemente en el genoma. De nuevo, si es necesario un balance adecuado de los distintos factores de transcripción para iniciar el proceso de desmetilación, puede que éstos no se encuentren en cantidad suficiente.

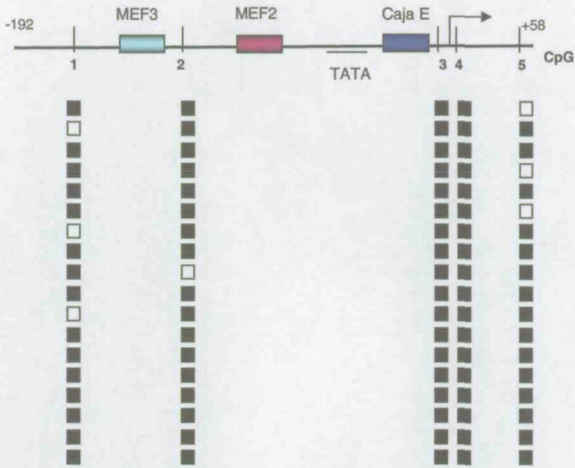


Fig. 21. Las células C2C12 establemente transfectadas no desmetilan el promotor de miogenina. ADN procedente de células C2C12 establemente transfectadas con la construcción silvestre metilada (wt+), y diferenciadas durante 7 días fue analizado tras el tratamiento con bisulfito sódico. La figura muestra el estado de metilación del promotor de miogenina en 18 clones. Los cuadrados blancos representan citosinas sin metilar mientras que los negros indican citosinas modificadas.

Como se menciona más arriba, hasta la fecha sólo hay un caso descrito en la literatura en el cual un factor de transcripción (lacI) es capaz de producir la desmetilación de su secuencia de reconocimiento (lacO) cuando está establemente integrada en el genoma (Han et al., 2001). Sin embargo, la desmetilación es parcial y variable dependiendo del clon analizado. Además el grado de desmetilación es menor que cuando se analiza la misma secuencia en un sistema episomal, donde la estructura de la cromatina es menos compacta.

Por este motivo decidimos analizar si la construcción metilada de miogenina se desmetila cuando se introduce transitoriamente en células musculares. Para ello, transfectamos células C2C12 con plásmidos conteniendo el fragmento entre -4.2 y +1.5 del gen metilado. Las células se recogieron tras 6 días en medio bajo en suero y se aisló

el ADN plasmídico. Éste se analizó mediante tratamiento con bisulfito y, los resultados se muestran en la figura 22.

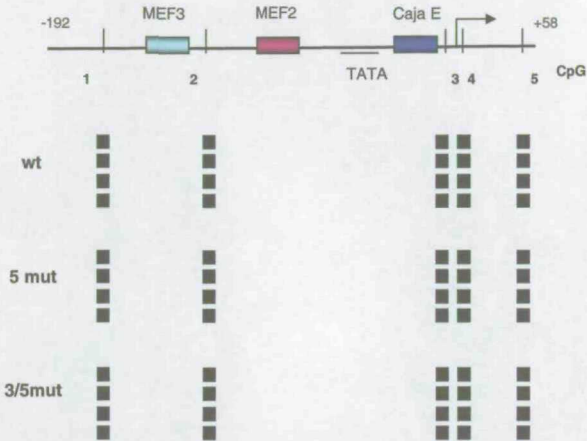


Fig. 22. Las células C2C12 no desmetilan el promotor de miogenina en ensayos de transfecciones transitorias. Las células fueron transfectadas con 2.5 µg de las construcciones de miogenina indicadas, metiladas *in vitro* con Sss1. Tras 6 días en medio de diferenciación se extrajo el ADN plasmídico y se analizó tras el tratamiento con bisulfito sódico. La figura muestra el estado de metilación del promotor en la construcción salvaje, así como en construcciones que contienen el sitio de unión de myf5 (5mut) o los sitios de myf5 y mef3 (3/5 mut) mutados.

Como se ve, aunque el número de clones analizados es menor tampoco en este caso observamos desmetilación del promotor. De nuevo este resultado podría explicarse si el balance de proteínas necesarias para promover la desmetilación de esta secuencia, no es suficiente para actuar sobre el plásmido metilado. La realización de experimentos adicionales en los que se transfectasen las células con vectores de expresión para los distintos factores de transcripción, podría ayudar a estudiar si estos factores juegan un papel en la desmetilación del promotor observada durante el desarrollo.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

1. METILACIÓN DEL ADN Y DESARROLLO EN VERTEBRADOS

La disrupción en ratón de proteínas implicadas en el establecimiento, mantenimiento e interpretación del patrón de metilación genómica permite concluir que los genes responsables de estos procesos son esenciales para el correcto desarrollo del organismo. De este modo se ha observado que la alteración del patrón global de metilación es letal en mamíferos (Li et al., 1992; Okano et al., 1999), y que incluso alteraciones locales que conducen a hipo o hipermetilación de genes regulados por *imprinting* pueden dar lugar a anomalías durante el desarrollo (Tycko and Ashkenas, 2000). Por otra parte, la mutación de algunos de estos genes ha sido asociada con enfermedades en humanos. Así, mutaciones en el gen de la metiltransferasa *de novo* DNMT3B da lugar al síndrome ICF (*Immunodeficiency, Centromeric instability, Facial anomalies*) mientras que mutaciones en el gen de la proteína de unión a ADN metilado MeCP2 por su parte, son las responsables del síndrome de Rett.

A pesar de la indudable importancia de esta modificación epigenética, el papel que juega durante el desarrollo sigue dando lugar a controversia después de más de 25 años de estudio. Parece claro que la metilación del ADN está implicada, aunque no es la única responsable, en el silenciamiento irreversible de muchos genes regulados por *imprinting* o situados en el cromosoma X inactivo en hembras de mamíferos. Por otro lado, un número creciente de estudios apoyan la idea de que esta modificación surgió inicialmente como mecanismo de defensa frente a transposones. Además, se ha propuesto un posible mecanismo de metilación y desmetilación de secuencias reguladoras en la expresión de genes específicos de tejido. Sin embargo, como hemos visto, la relación entre la metilación del ADN y la represión de genes durante el desarrollo no está tan clara.

En este trabajo nos hemos planteado la hipótesis de que la metilación del ADN pudiese estar jugando un papel en restringir la activación inicial de genes durante el desarrollo en ratones. La metilación de secuencias reguladoras conduce a una represión de la expresión génica que, en el caso de regiones con una densidad baja de CpGs, podría ser revertida en presencia de un *enhancer* fuerte (Boyes and Bird, 1992). Así pues, estaríamos ante un proceso dinámico en el cual el balance entre la activación y la

represión génica de secuencias metiladas dependería de la presencia de transactivadores específicos, capaces de desplazar a las proteínas de unión a ADN metilado (Bird, 1992).

Para empezar a estudiar si la metilación del ADN juega un papel en restringir la expresión génica en células progenitoras hasta un que número suficiente de factores de transcripción se encuentren presentes, hemos analizado desde que estado se activan por primera vez una serie de genes específicos de tejido con una densidad baja de CpGs. Para ello hemos utilizado dos sistemas distintos. El primero consiste en la activación de genes específicos de sangre en células madre hematopoiéticas procedentes de ratones adultos. En el segundo, se analiza el estado de metilación del promotor de miogenina durante el proceso de miogénesis en embriones de ratón.

2. DESMETILACIÓN DE SECUENCIAS REGULADORAS Y ACTIVACIÓN GÉNICA

2.1. Células madre hematopoiéticas: potencial de diferenciación y plasticidad celular

En los últimos años el interés por las células madre procedentes de animales adultos ha aumentado considerablemente. Su capacidad de dividirse indefinidamente tanto *in vivo* como *in vitro*, así como de diferenciarse hacia distintos tipos celulares, hacen de ellas un modelo atractivo para el estudio de los mecanismos que regulan la diferenciación celular. Al mismo tiempo, la observación de que células madre procedentes de un tejido pueden ser capaces de diferenciarse hacia células de otros tejidos permite pensar en ellas como una potente herramienta terapéutica. Aunque este fenómeno de transdiferenciación celular se ha visto sometido a controversia en los últimos años (Wagers et al., 2002), se ha sugerido que en él podrían estar implicados mecanismos de reprogramación génica que incluirían una desmetilación del genoma (Reik et al., 2001). Estos mismos mecanismos se sabe que juegan un papel muy importante en el correcto desarrollo de embriones clonados a partir de núcleos de células somáticas procedentes de adultos (revisado en Dean et al., 2003; Reik and Dean, 2003).

Dejando a un lado el fenómeno de transdiferenciación, las células madre hematopoiéticas deben elegir uno entre los ocho posibles linajes dentro del sistema hematopoiético. Podríamos pensar que en esta decisión fundamental juega un papel importante la expresión de distintos factores de transcripción específicos para los

diferentes linajes. Sin embargo, ratones deficientes en algunos de estos factores como GATA-1, Pu-1 o Ikaros sugieren que la decisión inicial de diferenciar hacia un linaje u otro puede ser independiente de ellos (Orkin and Zon, 1997; Shivdasani and Orkin, 1996). Se ha propuesto que esta decisión es en realidad un proceso al azar, facilitado por la elevada plasticidad de estas células (Enver and Greaves, 1998).

2.2. Las células madre lin-, c-kit+, Sca-1+ coexpresan genes de varios linajes hematopoiéticos

La aparición en los últimos años de técnicas que permiten tanto el aislamiento como el cultivo de distintas poblaciones hematopoiéticas con capacidad multipotencial, han permitido avanzar rápidamente en su caracterización. Los primeros estudios demostraron que estas poblaciones se encuentran preactivadas para varios linajes hematopoiéticos. Así, estudios de expresión por RT-PCR mostraron que estas células coexpresan genes íntimamente ligados con diferentes linajes (incluyendo β -globina, MPO, IgH, EpoR y CD3 δ), y ensayos de accesibilidad de sus secuencias reguladoras indicaron que éstas eran simultáneamente activas en células con capacidad multipotencial (revisado en Cross and Enver, 1997). El desarrollo de técnicas de RT-PCR múltiple en células individuales confirmó que incluso en una única célula coexisten factores específicos de linajes diferentes y permitió observar que esta preactivación se produce al azar (Delassus et al., 1999; Hu et al., 1997). El análisis de coexpresión de β -globina, MPO y EpoR en células lin-, c-kit+, Sca-1+ permiten concluir que la preactivación génica también sucede en células madre con capacidad de reconstitución a largo plazo procedentes de ratones adultos.

2.3. Las regiones reguladoras de genes hematopoiéticos se activan desde un estado no metilado en células madre

Mediante secuenciación genómica de ADN tratado con bisulfito sódico hemos demostrado que varias de estas secuencias reguladoras, como el *enhancer* distal de MPO, el *enhancer* intrónico de IgH o el promotor de EpoR, se encuentran desmetiladas simultáneamente en al menos una subpoblación de estas células. Parece también que el mayor o menor grado de desmetilación de una secuencia dada se correlaciona con el número de células madre que transcriben el gen.

Además hemos estudiado si el estado basal a partir del cual se activan estos genes varía durante la diferenciación de las células madre hacia células de diferentes linajes. Mediante el análisis del estado de metilación de secuencias reguladoras en distintas poblaciones hematopoiéticas, hemos demostrado que todas ellas permanecen desmetiladas en las poblaciones celulares que expresan cada uno de los genes. Además, en el caso concreto de IgH y EpoR, sus regiones reguladoras se encuentran metiladas en células de sangre que no expresan dichos genes. Esto nos sugiere que la metilación del *enhancer* intrónico de IgH y del promotor de EpoR podría estar ayudando a mantenerlos en un estado inactivo en células donde no deban expresarse. Un fenómeno parecido se observa en el *enhancer* intrónico de la cadena ligera κ de las inmunoglobulinas. Este *enhancer* se desmetila durante el proceso de maduración de células B, y se ha propuesto que su desmetilación es necesaria para la activación del locus (Lichtenstein et al., 1994).

En el caso de MPO no hemos detectado cambios en el patrón de metilación de su *enhancer*, el cual permanece siempre sin metilar en todas las células hematopoiéticas analizadas, incluso aunque no expresen el gen. Podemos concluir, por tanto, que la metilación de esta secuencia no juega ningún papel en restringir la expresión de MPO en otros tipos celulares, al menos de sangre. Su expresión dependiente de tipo celular vendría regulada por otros mecanismos, y de hecho se ha descrito que depende de la unión de diferentes isoformas del factor C/EBP al *enhancer*, y de los distintos estados de fosforilación de estas isoformas (Ford et al., 1996). Hay que señalar que, en humanos, la región promotora del gen de MPO sufre cambios en el patrón de metilación, dependientes del estado de diferenciación (Lubbert et al., 1991). Sin embargo hay que tener cautela a la hora de interpretar estos resultados, ya que los estudios se realizaron en líneas celulares, y utilizando enzimas de restricción sensibles a metilación. Mediante la digestión con enzimas de restricción sólo pueden ser analizadas aquellas citosinas situadas en el sitio de reconocimiento de la enzima. La ventaja de utilizar el método de secuenciación genómica tras el tratamiento con bisulfito sódico es obvia, ya que permite analizar al mismo tiempo todos los CpGs en una secuencia dada. Adicionalmente, el realizar los estudios sobre células aisladas directamente del animal permite evitar posibles alteraciones en el patrón de metilación.

Como hemos visto, las regiones promotoras de una serie de genes específicos de sangre parecen estar simultáneamente activadas en células madre hematopoiéticas, también en términos de desmetilación de ADN. Al igual que sucede con la coexpresión de genes de distintos linajes en células individuales, no todos los alelos de todos los

genes analizados están desmetilados al mismo tiempo en la misma población. Estudios previos de genes como GATA-1 o EpoR, que están preactivados a nivel de cromatina en células multipotentes, revelan que sólo una fracción de los sitios es completamente accesible en dichas células (Heberlein et al., 1992; Ronchi et al., 1997; Yousoufian, 1994). La ausencia de una remodelación completa como la que se observa en células maduras puede ser la responsable de mantener a las células en un estado de semiactivación para varios, si no todos, los linajes hematopoiéticos. Desde este estado basal es fácil pensar que el aumento estocástico de los niveles de un factor determinado pueda determinar a la célula hacia un linaje u otro. Una vez iniciada la diferenciación, las células mantendrían esta opción elegida al azar mediante la activación de los genes adecuados y el silenciamiento de aquellos relacionados con otros tipos celulares.

2.4. El promotor de miogenina se encuentra desmetilado en una subpoblación de células lin⁻, c-kit⁺, Sca-1⁺

Además de las secuencias reguladoras de genes hematopoiéticos, hemos analizado el estado de metilación del promotor de miogenina en células lin⁻, c-kit⁺, Sca-1⁺. Miogenina pertenece a la familia de factores de transcripción específicos de músculo con un dominio bHLH y es absolutamente necesaria para la diferenciación de músculo esquelético (revisado en Arnold and Braun, 2000). Nuestros datos sugieren que su promotor se encuentra metilado en todos los CpGs en la mayoría de las células progenitoras de sangre. Sin embargo, existe un pequeño porcentaje de alelos en los que esta secuencia se encuentra completamente desmetilada en los tres CpGs anteriores al inicio de la transcripción. Estas mismas citosinas están también sin metilar en células de músculo esquelético de ratones neonatos, que expresan cantidades elevadas del gen. A la vista de estos resultados decidimos estudiar si nuestra población lin⁻, c-kit⁺, Sca-1⁺ expresaba miogenina o algún otro factor muscular como Myf5, aunque el análisis por RT-PCR demostró que las células madre hematopoiéticas no expresan cantidades detectables de ninguno de estos genes. Parece, por tanto, que la desmetilación del promotor en algunas de las células no se corresponde con expresión del gen, lo que además elimina la posibilidad de que la población inicial esté contaminada con células de músculo.

Nuestros resultados sugieren que existe una pequeña subpoblación de células madre hematopoiéticas que podría mantener además algunos promotores de genes no hematopoiéticos en una conformación abierta. Sin embargo, es difícil comprobar que

este fenómeno sea funcionalmente relevante *in vivo*. Tampoco se puede analizar si estas células que mantienen desmetilado el promotor de miogenina, mantienen desmetiladas al mismo tiempo secuencias reguladoras de genes hematopoiéticos. Debido a esto y a la controversia aparecida durante el desarrollo de esta tesis acerca del potencial de transdiferenciación de células madre (Wagers et al., 2002), decidimos completar el estudio del papel de la metilación del gen de miogenina, con el estudio de la desmetilación de su promotor en un entorno más fisiológico: el proceso de miogénesis durante el desarrollo de ratones.

A lo largo de la primera parte de esta tesis hemos podido comprobar que las células madre hematopoiéticas suponen un modelo excelente para el estudio del papel de la metilación del ADN en la activación inicial de genes. Por un lado, nos permiten analizar el estado basal desde el cual se activan genes de todos los linajes hematopoiéticos. Por otro, al proceder de ratones adultos, podemos suponer que han alcanzado el patrón final de metilación, el cual se completa hacia el día 6.5 del desarrollo embrionario. Sin embargo, tienen también una desventaja, que es la propia preactivación génica a nivel transcripcional. Así, aunque estas células representan el estado basal desde el cual se activan muchos genes hematopoiéticos, el sistema no permite analizar el estado de metilación de las secuencias reguladoras justo antes de la activación de estos genes.

2.5. Desmetilación de miogenina durante el proceso de miogénesis en ratones

Esta situación sin embargo, sí es posible estudiarla *in vivo* en el caso de la activación inicial del gen de miogenina durante el desarrollo embrionario en ratones. Como hemos visto, la miogenina es un gen específico de músculo esquelético que se activa inicialmente en la somitas más anteriores de embriones de d8.5 (Sassoon et al., 1989). Un día más tarde, encontramos en el embrión un gradiente de expresión rostro-caudal del gen, como el que se observa en la figura 8 de los resultados. Es posible, por tanto, aislar células que ya han activado el gen en las somitas anteriores, de aquellas que todavía no expresan miogenina (somitas posteriores y mesodermo presomítico).

El análisis del estado de metilación del promotor en ambas poblaciones, así como en células de músculo esquelético de ratones neonatos nos permite concluir que el promotor de miogenina se desmetila durante el proceso de miogénesis en ratones. La desmetilación de cada uno de los cinco CpGs que contiene es de aproximadamente un

25-30% al pasar de somitas posteriores a somitas anteriores, con la excepción de CpG3. Ésta permanece sin metilar en casi todos los clones procedentes de células musculares o con potencial miogénico, lo que no sucede en otros tipos celulares. Sin embargo, la importancia funcional de esta observación no se conoce. Los ensayos de retardo de la movilidad electroforética en gel utilizando sondas metiladas o sin metilar en esta citosina, sugieren que no está relacionada con la inhibición de la unión de proteínas específicas de músculo a dicha secuencia. Por otro lado, un examen más detallado de los resultados nos permite observar que, mientras que en células procedentes de somitas posteriores no encontramos ningún alelo completamente desmetilado, en somitas anteriores hasta un 40% de los clones están desmetilados en los CpGs que rodean a los sitios de unión para factores de transcripción. Un fenómeno similar se observa en el *enhancer* distal de MyoD, donde la desmetilación de CpGs es previa a la activación del gen (Brunk et al., 1996).

3. PAPEL DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN Y LA METILACIÓN DEL ADN EN LA GENERACIÓN DE CROMATINA ACTIVA

Utilizando el gen de miogenina como modelo, el segundo objetivo general de esta tesis fue estudiar el posible papel de los factores de transcripción en la activación de genes desde un estado metilado.

3.1. La expresión de miogenina depende de factores bHLH específicos de músculo y de proteínas de las familias MEF2 y Six

La expresión del gen de miogenina durante el desarrollo depende de tres familias de factores de transcripción: proteínas tipo bHLH específicas de músculo (Myf5, MyoD, miogenina y MRF4), proteínas de la familia MEF2 (MEF2A-D) y factores con un dominio homeobox de la familia Six (Six 1 y 4). El promotor de miogenina tiene sitios de unión para todos ellos, y la mutación de estas secuencias en ratones en los que la expresión de lacZ está bajo el control del promotor tiene distintos efectos, aunque todas ellas son esenciales para una expresión correcta del gen. Así la mutación de la caja E proximal elimina completamente la expresión de lacZ en el contexto del promotor mínimo (Yee and Rigby, 1993), mientras que la mutación de los sitios de unión para MEF2 y Six da lugar a un patrón de expresión alterado del transgén. En ambos casos sólo se obtiene activación en una subpoblación limitada de las células que expresan

miogenina, siendo lo más característico el retraso o eliminación completa de la activación en los músculos de las extremidades (Spitz et al., 1998; Yee and Rigby, 1993).

Por otro lado, resultados similares se han obtenido utilizando modelos animales en los que se han eliminado algunas proteínas de estas familias. Así, mientras que ratones deficientes en MyoD no tienen ningún fenotipo muscular, la eliminación de Myf5 da lugar a un retraso en la activación de miogenina y en la formación de miotomos. Sin embargo, el proceso de miogénesis en estos ratones continúa normalmente a partir de la activación de MyoD, lo que sugiere que ambas proteínas tienen efectos solapantes. Esto se confirma con la observación de que el doble mutante para ambas proteínas no forma músculo esquelético (Arnold and Braun, 1996). Por su parte, ratones deficientes en Six1 presentan un retraso en la activación de miogenina y MyoD en los precursores de músculos de las articulaciones (Laclef et al., 2003).

Nuestros datos de RT-PCR en células individuales de somitas de embriones de e9.5 están acuerdo con el papel previamente descrito para estas proteínas en la activación de miogenina durante el desarrollo. Hemos visto que MEF2A se expresa en la mayoría de las células tanto en somitas anteriores como posteriores, y que entre un 30 y un 45 % coexpresan MEF2A y Six1. Sin embargo, la expresión de miogenina es absolutamente dependiente de Myf5, y sólo se detecta en células de somitas anteriores que coexpresan los tres factores. En células procedentes de somitas posteriores sólo se observa expresión de Myf5 en los pocillos que contienen 100 células, donde no se observa todavía expresión de miogenina. Esta aproximación presenta la ventaja sobre los estudios mediante hibridación *in situ* o tinción con β -gal de permitirnos estudiar la expresión de los distintos factores en una célula dada.

Por otra parte, las transfecciones transitorias del promotor de miogenina en células CV-1 confirmaron que Myf5, MEF2A y Six1 son capaces de activar el promotor cuando éste se encuentra sin metilar y que el efecto es aditivo y máximo cuando se cotransfectan los tres factores. En esta misma dirección, la mutación de los tres sitios de unión en el promotor proximal disminuye notablemente la activación del promotor sin metilar en células musculares C2C12 diferenciadas. La actividad residual que se observa en la construcción mutada puede ser debida a la presencia de otras cajas E en la región 5' reguladora del promotor (Yee and Rigby, 1993).

3.2. La metilación del promotor de miogenina inhibe su activación transcripcional en ensayos de transfecciones transitorias

Durante el desarrollo de esta tesis quisimos estudiar el efecto que tenía la metilación del promotor de miogenina en la activación del gen y el papel de los distintos factores de transcripción en la activación desde un estado metilado. Los experimentos iniciales de transfecciones transitorias con el promotor de miogenina demostraron que la metilación del plásmido inhibe la expresión del gen tanto en células CV-1 como en miotubos C2C12. En el caso de los fibroblastos CV-1 tampoco se obtuvo activación tras la cotransfección de la construcción metilada con vectores de expresión para Myf5, MEF2A y Six1. Parece, por tanto, que la presencia de los factores de transcripción necesarios para la expresión de miogenina no es suficiente para activar la transcripción cuando la construcción se encuentra metilada, al menos en ensayos de transfecciones transitorias. Estos resultados parecen contradecir la hipótesis de que en regiones con una densidad baja de CpGs la presencia de factores de transcripción específicos de tejido es suficiente para activar desde un estado metilado.

Sin embargo, esta aproximación experimental tiene una serie de desventajas, que podrían estar afectando al resultado observado. Por una parte, la metilación *in vitro* de las construcciones con la enzima SssI afecta a todas las citosinas en dinucleótidos CpG. La densidad de nucleótidos metilados es, por tanto, mayor a la observada en somitas posteriores de embriones de e9.5, que representarían el estado basal de activación inicial del promotor durante el desarrollo. Además, la enzima estaría metilando también las secuencias del gen de la luciferasa, y del vector en el que promotor y gen reportero están clonados. Aunque la densidad de CpGs en el gen de la luciferasa es aproximadamente igual a la del gen de miogenina, el promotor, de origen bacteriano, tiene un alto contenido en este dinucleótido. Por tanto, la densidad de metilación en nuestras construcciones es mucho mayor que la del gen endógeno, y podría ser lo suficientemente elevada como para dar lugar a una represión estable de la transcripción. Un fenómeno similar se ha observado en ensayos de transfecciones transitorias con el promotor del gen de prolactina (Ngo et al., 1996). En este trabajo se observa que, mientras que la metilación del plásmido entero inhibe completamente la activación del promotor en células que expresan el gen, la metilación diferencial que afecta exclusivamente a secuencias del gen de prolactina permite obtener un 40% de la activación que se obtiene con el plásmido sin metilar. Es probable por tanto, que la metilación de secuencias exógenas pueda estar afectando también al resultado obtenido

con el promotor de miogenina. La realización de experimentos adicionales en los que se metile diferencialmente la construcción, dejando el vector y el gen de la luciferasa sin modificar, podría permitir abordar este problema.

El segundo inconveniente de las transfecciones transitorias consiste en que el plásmido no es capaz de replicar en las células en nuestras condiciones experimentales. Por tanto, si para la activación del gen es necesaria una desmetilación de las secuencias reguladoras, y esta desmetilación es pasiva y dependiente de replicación, tampoco seríamos capaces de detectarla.

3.3. El promotor de miogenina se encuentra en una conformación accesible a nucleasas en miotubos C2C12

Por todo ello, decidimos adoptar una aproximación experimental que mimetizase mejor lo que está ocurriendo en el interior de la célula. El ADN en una célula eucariota está empaquetado junto con histonas y otras proteínas en una estructura denominada cromatina. La unidad básica de esta estructura, el nucleosoma, está formada por 146 pb de ADN enrollados alrededor de un octámero de proteínas, compuesto por dos copias de cada una de las histonas H2A, H2B, H3 y H4. A su vez los nucleosomas interaccionan entre sí para dar lugar a una estructura compacta que limita el acceso al ADN genómico, reprimiendo así la expresión génica. Sin embargo, los promotores y *enhancers* de genes transcripcionalmente activos suelen estar asociadas con sitios de hipersensibilidad a nucleasas, que carecen de nucleosomas convencionales (Felsenfeld et al., 1996).

En este trabajo hemos analizado la presencia de sitios de hipersensibilidad a DNasas en el gen de miogenina de ratón. Hemos observado que, como era previsible, el promotor proximal del gen se encuentra en una conformación más accesible a nucleasas en células C2C12 diferenciadas. Además hemos detectado la presencia de otras dos regiones de hipersensibilidad (HS2 y HS3) en estas células, situadas en el primer intrón del gen. Los tres sitios fueron confirmados mediante la digestión de los núcleos con enzimas de restricción, en un ensayo que tiene además la ventaja de ser cuantitativo. Aunque la importancia funcional de los sitios HS2 y HS3 no ha sido analizada, el análisis comparativo de la secuencia del primer intrón indica que la región 5' del mismo está altamente conservada en ratón, rata y humanos. Esto sugiere que puedan ser relevantes en el control transcripcional del gen. A favor de esta hipótesis está la observación de que el control transcripcional de *Myf5*, que tiene una distribución

similar de intrones y exones a miogenina, está regulado por varios *enhancers* discretos, uno de ellos situado en este primer intrón (Hachouel et al., 2003).

3.4. Influencia de los factores bHLH específicos de músculo y de proteínas MEF2 y Six en la formación del sitio HS1 del promotor de miogenina

La activación inicial de genes durante el desarrollo viene acompañada por la formación de sitios hipersensibles a DNasas en regiones reguladoras de locus inicialmente silentes. Estudios con el *enhancer* β^A/ϵ de la globina de pollo y el sitio HS-4 de la β -globina humana demostraron que la formación de un HS depende de la unión aditiva de factores de transcripción específicos de tejido a sus secuencias (Boyes and Felsenfeld, 1996; Stamatoyanopoulos et al., 1995). Mediante ensayos de accesibilidad a enzimas de restricción en líneas celulares conteniendo distintas mutaciones en el promotor de miogenina, hemos demostrado que la formación del HS depende de la presencia de sitios de unión para factores de las familias MEF2 y Six. Sorprendentemente, la mutación de la caja E proximal del promotor por sí misma no tiene ningún efecto en la formación del HS1. Esto podría ser debido a que todas las construcciones mantienen intacta una segunda caja E en el extremo más 5' del promotor, ya que se ha descrito que la expresión de miogenina en ratones transgénicos depende de la presencia de una de estas secuencias, aunque su localización parece no tener importancia (Yee and Rigby, 1993). Sin embargo, la secuencia concreta de esta segunda caja E del promotor de miogenina no une factores de la familia bHLH, al menos en ensayos de retardo en gel (Edmondson et al., 1992). Por otra parte, los datos de RT-PCR en células individuales mostraban que un 30-45% de las células coexpresan MEF2A y Six1 tanto en somitas anteriores como posteriores, mientras que la activación de miogenina viene determinada por la expresión de Myf5 que aparece más tarde. En conjunto nuestros datos parecen indicar que mientras que proteínas de unión a los sitios *mef2* y *mef3* son necesarias para la generación de cromatina activa en el promotor de miogenina, los factores bHLH (y en concreto Myf5) jugarían un papel posterior en la activación inicial del gen.

Estos resultados concuerdan con trabajos en los que se describe que las proteínas MEF2 pueden jugar un papel en remodelar la cromatina alrededor del promotor de miogenina durante la diferenciación de células de músculo. Se sabe que en mioblastos sin diferenciar, MEF2 recluta proteínas deacetilasas de histonas de clase II (HDAC 4, 5, 7 y 9) a promotores específicos de músculo. Estas proteínas a su vez, están asociadas a

HP1, molécula adaptadora que se une a metilasas de la histona H3 en la lisina 9, reprimiendo la expresión génica (Zhang et al., 2002). Tras la inducción de la diferenciación, estas HDACs se disocian de MEF2 y se translocan al citoplasma, en un proceso señalizado por la ruta de la calcio calmodulina quinasa (CaMK) y dependiente de chaperonas (Lu et al., 2000; McKinsey et al., 2000a; McKinsey et al., 2000b). Durante el proceso de diferenciación a miotubos, MEF2 se une a proteínas coactivadoras con actividad acetiltransferasa como GRIP-1 (Chen et al., 2000), o CBP (De Luca et al., 2003; Sartorelli et al., 1997). De hecho, la actividad acetiltransferasa de CBP es necesaria para la diferenciación miogénica (Poleskaya et al., 2001). MEF2 también se une a proteínas con actividad metiltransferasa de histonas como CARM1 (Chen et al., 2002). Todas estas proteínas están asociadas con la generación de cromatina activa.

Sin embargo, la observación de que la mutación de la caja E proximal no afecta a la formación del sitio de hipersensibilidad en el promotor no concuerda fácilmente con trabajos publicados por otros grupos. Nuestros resultados indicarían que los factores que se unen a esta secuencia, como MyoD o Myf5, a pesar de ser necesarios para la expresión del gen, no juegan un papel fundamental en la formación del sitio HS. En clara contradicción con nuestras observaciones, la sobreexpresión de MyoD en fibroblastos 10T1/2 es capaz de aumentar la accesibilidad del promotor de miogenina a enzimas de restricción, así como de iniciar la expresión del gen endógeno (Gerber et al., 1997). Aunque estos resultados sugieren que MyoD sí que es necesario para remodelar la cromatina alrededor de promotores musculares es conveniente tener en cuenta las diferencias entre las dos aproximaciones experimentales. En el trabajo mencionado, los autores sobreexpresan establemente una proteína de fusión entre MyoD y la región de unión a ligando del receptor de estrógenos (ER), y analizan la formación de HS en presencia o ausencia de hormona. En este contexto, no se puede eliminar la posibilidad de que sea el dominio de ER el que reclute moléculas remodeladoras de cromatina al promotor. De hecho, se ha descrito que p300/CBP, así como GRIP-1 o CARM1, interaccionan con el dominio de unión a hormona de ER y otros receptores nucleares de forma dependiente de ligando (Chakravarti et al., 1996; Hanstein et al., 1996).

La segunda diferencia fundamental entre los dos trabajos, es el tipo celular utilizado. Así, nuestros estudios fueron realizados en células específicas de músculo C2C12, mientras que Gerber y cols. utilizaron fibroblastos de origen pan-mesodérmico

10T1/2. Quizás, la diferencia entre los resultados obtenidos se deba a que los requerimientos en ambos tipos celulares sean diferentes y que MyoD o Myf5 sean necesarios, además de otros factores, para la activación de genes musculares en células más primitivas.

Es necesario mencionar también que existen otros trabajos que relacionan a MyoD con actividades remodeladoras de cromatina. Al igual que sucedía con MEF2, se ha descrito que en mioblastos sin diferenciar MyoD interacciona con deacetilasas de histonas, en este caso de clase I (Mal et al., 2001) y con proteínas correpresoras como N-CoR (Bailey et al., 1999). La inducción de la diferenciación da lugar a la disociación de HDACs y unión de proteínas con actividad acetilasa como CBP/p300 (Eckner et al., 1996; Puri et al., 1997a; Sartorelli et al., 1997; Yuan et al., 1996) o PCAF (Puri et al., 1997b). En miotubos diferenciados MyoD también es capaz de interaccionar con factores remodeladores de cromatina dependientes de ATP de la familia de SWI/SNF (de la Serna et al., 2001a; de la Serna et al., 2001b).

3.5. La metilación del promotor de miogenina disminuye el número de células capaces de formar un HS

Como hemos visto en la introducción de esta tesis parece que la metilación del ADN inhibe la expresión génica porque afecta a la estructura de la cromatina. Estudios en los que se transfectó establemente el gen de α -actina metilado o sin metilar en células L de ratón, demostraron que la metilación de la construcción dirigía al transgén a una estructura más resistente a DNasas (Keshet et al., 1986). Por otro lado la integración de un transgén metilado en regiones específicas del genoma inhibe su transcripción con respecto al transgén sin metilar. Esta represión ocurre en ausencia de metilación de novo y va acompañada de hipoacetilación de histonas H3 y H4 alrededor de las secuencias flanqueantes (Schubeler et al., 2000). En las condiciones utilizadas por estos autores el promotor del gen metilado se encuentra en una conformación insensible a DNasas mientras que el *enhancer* se desmetila y adopta una conformación más accesible a estas nucleasas. Sin embargo, la remodelación del *enhancer* no es suficiente para activar la transcripción del gen.

Utilizando líneas celulares transfectadas con la construcción salvaje de miogenina metilada *in vitro*, hemos observado que la metilación de secuencias reguladoras disminuye la probabilidad de formar un sitio HS en más de un 60%, aunque no la anula completamente. Hemos investigado además cuál puede ser el mecanismo

responsable de esta inhibición, mediante estudios cinéticos de corte con enzimas de restricción en núcleos. Se pueden proponer dos modelos, que están representados en la figura 1. En el primero, la unión de factores de transcripción a sus secuencias aumentaría la probabilidad de mantener la región libre de nucleosomas, de forma que se crearía un sitio completamente activo, mientras que la unión de MBDs a CpGs metiladas mantendría la región en un estado inaccesible. La menor accesibilidad en el caso de las líneas transfectadas con la construcción metilada vendría dada por la existencia de dos subpoblaciones de núcleos, una hipersensible y otra inaccesible. En este caso la digestión de núcleos con enzimas de restricción seguiría una cinética similar a la observada con la construcción sin metilar.

El segundo modelo propone la existencia de una única población de núcleos, en la cual factores de transcripción y MBDs intentarían unirse al mismo tiempo al promotor. En este caso, la digestión con enzimas de restricción sería más lenta, pero éstas acabarían cortando en todos los sitios. Nuestros resultados apuntan a que la metilación del ADN disminuye el número de células capaces de formar un sitio de hipersensibilidad, pero que en aquellas en que se forma, el sitio es completamente activo. Esta observación tiene importantes consecuencias, ya que implica que existe un pequeño porcentaje de células en las cuales la presencia de factores de transcripción es capaz de contrarrestar los efectos inhibitorios de la metilación del ADN.

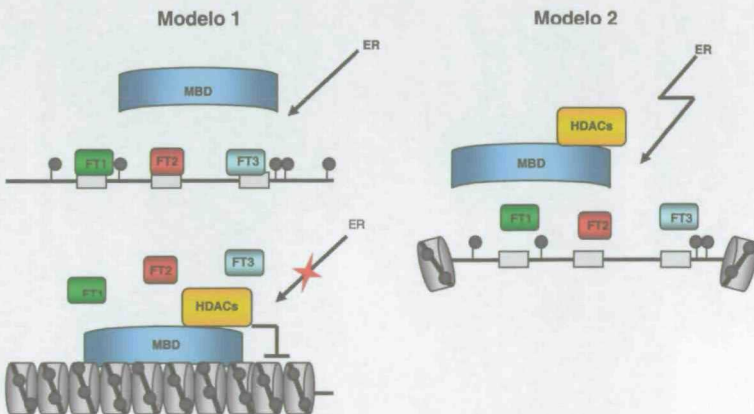


Fig. 1. Modelos de inhibición de la formación de un HS por metilación. El modelo 1 supone la existencia de dos subpoblaciones de núcleos, una en la cual los factores de transcripción (FTs) son

capaces de desplazar completamente a las proteínas de unión a ADN metilado, y otras en la cual son estas proteínas las que se unen a citosinas metiladas (esferas grises). La unión de MBDs al promotor es capaz de reclutar proteínas con actividad deacetilasa (HDAC), compactando así los nucleosomas y excluyendo la unión de los FTs. En el segundo modelo los FT y las MBDs compiten por unirse a una misma secuencia reguladora, generando en todas la células una estructura que es sólo parcialmente accesible a las enzimas de restricción (ER) utilizadas en los ensayos.

3.6. Ausencia de desmetilación del promotor de miogenina metilado *in vitro* durante la diferenciación de células C2C12

Trabajos con el gen de miogenina de ratón muestran que durante la diferenciación de células C2C12 de mioblastos amiotubos la desmetilación de una citosina en la región 5' reguladora es previa a la expresión del gen (Lucarelli et al., 2001). Además, nuestros resultados indican que las citosinas situadas en el promotor proximal de miogenina se desmetilan progresivamente durante el proceso de miogénesis en ratones. Este desmetilación parece ser previa a la activación del gen, ya que el número de células que expresan miogenina en somitas anteriores es menor al porcentaje de alelos completamente desmetilados en el promotor. Todo esto nos llevó a investigar si las células C2C12 podrían desmetilar el promotor de miogenina en construcciones metiladas *in vitro* en respuesta a estímulos de diferenciación.

Se ha descrito que en algunos casos la formación de un sitio de hipersensibilidad es previa y al mismo tiempo necesaria para la desmetilación de las secuencias asociadas. Por otra parte esta desmetilación podría ser debida a la presencia de factores de transcripción específicos (Han et al., 2001; Hsieh, 1999). Nuestros resultados indican que, aunque la metilación del promotor de miogenina disminuye en más de un 60% la probabilidad de formar el HS, el promotor es completamente accesible en un pequeño porcentaje de las células. Además las células C2C12 diferenciadas contienen todos los factores de transcripción necesarios para la expresión de miogenina (datos no mostrados). Teniendo esto en cuenta, parece lógico pensar que el proceso de diferenciación de células C2C12 transfectadas con el gen de miogenina metilado conduciría a una desmetilación de sus secuencias reguladoras, al menos en un porcentaje de las células. Nuestros resultados, por el contrario, sugieren que la presencia de los factores de transcripción adecuados no son suficientes para desmetilar el promotor de miogenina en células transfectadas con el promotor metilado *in vitro*. Sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, el sistema presentaba una serie de desventajas, siendo las más destacadas la presencia de un elevado número de copias del

transgén y el mayor grado de metilación del mismo con respecto al gen endógeno. Si es necesario un correcto balance entre factores de transcripción y MBDs para que se produzca esta desmetilación, no seríamos capaces de detectarla. Quizás la cotransfección en células C2C12 del promotor metilado junto con vectores de expresión para los distintos factores de transcripción nos ayudase a solucionar este problema.

4. CONCLUSIONES FINALES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

En los últimos años han aparecido una serie de trabajos en los que se revisa el papel de la metilación del ADN en la regulación de la expresión génica. Cabe destacar los estudios recientes realizados con embriones de *Xenopus*, donde la eliminación de la proteína xDNMT1 materna utilizando un ARN antisentido da lugar a una activación prematura de una serie de genes importantes para el desarrollo antes de la transición midblástula (Stancheva et al., 2002; Stancheva and Meehan, 2000). Sin embargo en ningún caso se detectó expresión ectópica de los genes analizados. En su conjunto, estos resultados sugieren que la metilación del ADN puede jugar un papel en regular el momento de activación de genes durante el desarrollo en *Xenopus*. La observación en ratones de que el promotor de miogenina presenta un grado de metilación mayor en células de somitas que no expresan el gen, junto con el hecho de que la metilación de esta secuencia disminuye el número de células capaces de formar un sitio de hipersensibilidad, sugieren que esta modificación puede ayudar a mantener el estado inactivo hasta el momento adecuado del desarrollo.

El estudio del papel de la metilación del ADN en el control de la expresión génica en mamíferos ha estado sujeto a la complejidad del fenotipo de los ratones deficientes en las distintas metiltransferasas y MBDs (Hendrich et al., 2001; Lei et al., 1996; Li et al., 1992; Okano et al., 1999; Tate et al., 1996; Walsh and Bestor, 1999). Sin embargo, trabajos muy recientes han demostrado que la expresión del gen de IL-4 en células Th2 depende de un balance adecuado entre MBD2 y el factor GATA-3, responsable de la activación del gen (Hutchins et al., 2002). Además, ratones deficientes tanto en MBD2 como en DNMT1 presentan expresión ectópica de dicha citoquina (Hutchins et al., 2002; Makar et al., 2003). Sería interesante por tanto, analizar si la eliminación de alguna de estas proteínas afecta a la expresión de miogenina durante el desarrollo embrionario. La disponibilidad y viabilidad de ratones deficientes en MBD2, que podrían cruzarse con ratones en los que la expresión de lacZ está bajo el control del

promotor de miogenina, permitiría el análisis de la expresión del transgén en somitas de embriones de diferentes edades.

Por otra parte, estudios con el promotor del gen de la tirosina aminotransferasa (Tat) específico de hígado apoyan la idea de que la metilación del ADN pueda actuar como mecanismo de memoria en las células (Thomassin et al., 2001). En este trabajo se demuestra que el receptor de glucocorticoides (GR) induce la desmetilación de la región reguladora de Tat en respuesta a hormona, y que esta desmetilación prepara a la célula para futuras respuestas a glucocorticoides. Durante el desarrollo en roedores, GR induce desmetilación justo antes del nacimiento, momento en el cual el gen no es todavía inducible. Sin embargo, esta desmetilación podría preparar al promotor para la rápida estimulación por hipoglucemia que ocurre al nacer. De este modo, la metilación del ADN jugaría un papel en la determinación celular, permitiendo que las células “recordasen” una activación transcripcional previa y respondiesen al estímulo siguiente de forma más rápida. Una función parecida se ha propuesto para la metilación del *enhancer* distal del gen específico de músculo MyoD (Brunk et al., 1996). Como se ha mencionado anteriormente, se ha observado que este *enhancer* se desmetila durante el proceso de somitogénesis en ratones, y que dicha desmetilación es previa a la activación del gen. Sin embargo, la mutación de tres CpGs en dicho *enhancer* no da lugar a una expresión prematura o ectópica del gen. Aunque estos resultados pueden ser explicados de varias formas, los autores proponen que la desmetilación del *enhancer* en una subpoblación de células antes de la activación del gen, lo hacen más accesible y capaz de responder con mayor facilidad a futuras señales extracelulares. Quizás la desmetilación del promotor de miogenina que ocurre durante el proceso de miogénesis esté jugando un papel similar en la regulación del gen.

Como vemos, el estudio del papel que juega la metilación del ADN en el desarrollo en vertebrados es complejo, y sigue dando lugar a controversia. Sin embargo, el desarrollo de nuevas técnicas, así como el análisis de animales deficientes en las proteínas implicadas, puede ayudarnos a comprender mejor la función de una modificación que afecta al 70% de dinucleótidos CpG en mamíferos.

CONCLUSIONES



CONCLUSIONES

1. Las células madre hematopoiéticas lin⁻, c-kit⁺, Sca1⁺, procedentes de médula ósea de ratones adultos, coexpresan genes específicos de varios linajes hematopoiéticos.

2. Las regiones reguladoras de los genes de β -globina, IgH, y EpoR se encuentran desmetiladas simultáneamente en al menos una subpoblación de células lin⁻, c-kit⁺, Sca-1⁺. Además todas ellas permanecen desmetiladas en aquellos tipos celulares diferenciados que expresan cada uno de los genes.

3. El promotor de miogenina se encuentra desmetilado en una pequeña subpoblación de células lin⁻, c-kit⁺, Sca-1⁺, aunque dicha desmetilación no se corresponde con expresión del gen en estas células.

4. El promotor de miogenina se desmetila durante el proceso de miogénesis en ratón, de tal forma que el grado de metilación en somitas posteriores de embriones de e9.5 es mayor que en somitas anteriores. La desmetilación alrededor de los sitios de unión de factores de transcripción es completa en músculo esquelético de ratones neonatos.

5. La desmetilación del promotor de miogenina parece ser previa a la activación del gen, ya que el porcentaje de alelos desmetilados en somitas anteriores es mayor al número de células que expresan el gen. Este porcentaje se corresponde con el número de células individuales que coexpresan MEF2A y Six1.

6. El promotor de miogenina se encuentra en una conformación hipersensible a DNaseI en células C2C12 diferenciadas.

7. La formación del sitio de hipersensibilidad del promotor de miogenina sin metilar depende de los sitios de unión de factores de MEF2 y Six, y es independiente de la mutación de la caja E proximal del promotor. La mutación de esta secuencia coopera, sin embargo, con las dos otras mutaciones en la generación de un sitio completamente inaccesible.

8. La metilación del gen de miogenina disminuye el número de células capaces de formar un sitio de hipersensibilidad. En aquellas células que se forma, el sitio es completamente activo.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Aguirre-Arteta, A. M., Grunewald, I., Cardoso, M. C. and Leonhardt, H.** (2000). Expression of an alternative Dnmt1 isoform during muscle differentiation. *Cell Growth Differ* **11**, 551-9.
- Andrews, N. C. and Faller, D. V.** (1991). A rapid micropreparation technique for extraction of DNA-binding proteins from limiting numbers of mammalian cells. *Nucleic Acids Res* **19**, 2499.
- Antequera, F. and Bird, A.** (1993). Number of CpG islands and genes in human and mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 11995-9.
- Antequera, F., Boyes, J. and Bird, A.** (1990). High levels of de novo methylation and altered chromatin structure at CpG islands in cell lines. *Cell* **62**, 503-14.
- Arnold, H. H. and Braun, T.** (1996). Targeted inactivation of myogenic factor genes reveals their role during mouse myogenesis: a review. *Int J Dev Biol* **40**, 345-53.
- Arnold, H. H. and Braun, T.** (2000). Genetics of muscle determination and development. *Curr Top Dev Biol* **48**, 129-64.
- Avner, P. and Heard, E.** (2001). X-chromosome inactivation: counting, choice and initiation. *Nat Rev Genet* **2**, 59-67.
- Bailey, P., Downes, M., Lau, P., Harris, J., Chen, S. L., Hamamori, Y., Sartorelli, V. and Muscat, G. E.** (1999). The nuclear receptor corepressor N-CoR regulates differentiation: N-CoR directly interacts with MyoD. *Mol Endocrinol* **13**, 1155-68.
- Bell, A. C. and Felsenfeld, G.** (2000). Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the Igf2 gene. *Nature* **405**, 482-5.
- Bergman, Y. and Mostoslavsky, R.** (1998). DNA demethylation: turning genes on. *Biol Chem* **379**, 401-7.
- Bestor, T., Laudano, A., Mattaliano, R. and Ingram, V.** (1988). Cloning and sequencing of a cDNA encoding DNA methyltransferase of mouse cells. The carboxyl-terminal domain of the mammalian enzymes is related to bacterial restriction methyltransferases. *J Mol Biol* **203**, 971-83.
- Bhattacharya, S. K., Ramchandani, S., Cervoni, N. and Szyf, M.** (1999). A mammalian protein with specific demethylase activity for mCpG DNA. *Nature* **397**, 579-83.
- Bird, A.** (1992). The essentials of DNA methylation. *Cell* **70**, 5-8.

- Bjornson, C. R., Rietze, R. L., Reynolds, B. A., Magli, M. C. and Vescovi, A. L.** (1999). Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science* **283**, 534-7.
- Black, B. L., Martin, J. F. and Olson, E. N.** (1995). The mouse MRF4 promoter is trans-activated directly and indirectly by muscle-specific transcription factors. *J Biol Chem* **270**, 2889-92.
- Blackman, M. A. and Koshland, M. E.** (1985). Specific 5' and 3' regions of the mu-chain gene are undermethylated at distinct stages of B-cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 3809-13.
- Bober, E., Lyons, G. E., Braun, T., Cossu, G., Buckingham, M. and Arnold, H. H.** (1991). The muscle regulatory gene, Myf-6, has a biphasic pattern of expression during early mouse development. *J Cell Biol* **113**, 1255-65.
- Bonfils, C., Beaulieu, N., Chan, E., Cotton-Montpetit, J. and MacLeod, A. R.** (2000). Characterization of the human DNA methyltransferase splice variant Dnmt1b. *J Biol Chem* **275**, 10754-60.
- Boyes, J. and Bird, A.** (1991). DNA methylation inhibits transcription indirectly via a methyl-CpG binding protein. *Cell* **64**, 1123-34.
- Boyes, J. and Bird, A.** (1992). Repression of genes by DNA methylation depends on CpG density and promoter strength: evidence for involvement of a methyl-CpG binding protein. *Embo J* **11**, 327-33.
- Boyes, J. and Felsenfeld, G.** (1996). Tissue-specific factors additively increase the probability of the all-or-none formation of a hypersensitive site. *Embo J* **15**, 2496-507.
- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-54.
- Brady, G., Billia, F., Knox, J., Hoang, T., Kirsch, I. R., Voura, E. B., Hawley, R. G., Cumming, R., Buchwald, M. and Siminovitch, K.** (1995). Analysis of gene expression in a complex differentiation hierarchy by global amplification of cDNA from single cells. *Curr Biol* **5**, 909-22.
- Braun, T., Bober, E., Winter, B., Rosenthal, N. and Arnold, H. H.** (1990). Myf-6, a new member of the human gene family of myogenic determination factors: evidence for a gene cluster on chromosome 12. *Embo J* **9**, 821-31.

- Braun, T., Buschhausen-Denker, G., Bober, E., Tannich, E. and Arnold, H. H.** (1989). A novel human muscle factor related to but distinct from MyoD1 induces myogenic conversion in 10T1/2 fibroblasts. *Embo J* **8**, 701-9.
- Brazelton, T. R., Rossi, F. M., Keshet, G. I. and Blau, H. M.** (2000). From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* **290**, 1775-9.
- Brown, T. C. and Jiricny, J.** (1987). A specific mismatch repair event protects mammalian cells from loss of 5-methylcytosine. *Cell* **50**, 945-50.
- Bruniquel, D. and Schwartz, R. H.** (2003). Selective, stable demethylation of the interleukin-2 gene enhances transcription by an active process. *Nat Immunol* **4**, 235-40.
- Brunk, B. P., Goldhamer, D. J. and Emerson, C. P., Jr.** (1996). Regulated demethylation of the myoD distal enhancer during skeletal myogenesis. *Dev Biol* **177**, 490-503.
- Cairns, L. A., Crotta, S., Minuzzo, M., Moroni, E., Granucci, F., Nicolis, S., Schiro, R., Pozzi, L., Giglioni, B., Ricciardi-Castagnoli, P. et al.** (1994). Immortalization of multipotent growth-factor dependent hemopoietic progenitors from mice transgenic for GATA-1 driven SV40 tsA58 gene. *Embo J* **13**, 4577-86.
- Chakravarti, D., LaMorte, V. J., Nelson, M. C., Nakajima, T., Schulman, I. G., Juguilon, H., Montminy, M. and Evans, R. M.** (1996). Role of CBP/P300 in nuclear receptor signalling. *Nature* **383**, 99-103.
- Chandler, S. P., Guschin, D., Landsberger, N. and Wolffe, A. P.** (1999). The methyl-CpG binding transcriptional repressor MeCP2 stably associates with nucleosomal DNA. *Biochemistry* **38**, 7008-18.
- Chapman, V., Forrester, L., Sanford, J., Hastie, N. and Rossant, J.** (1984). Cell lineage-specific undermethylation of mouse repetitive DNA. *Nature* **307**, 284-6.
- Chen, S. L., Dowhan, D. H., Hosking, B. M. and Muscat, G. E.** (2000). The steroid receptor coactivator, GRIP-1, is necessary for MEF-2C-dependent gene expression and skeletal muscle differentiation. *Genes Dev* **14**, 1209-28.
- Chen, S. L., Loffler, K. A., Chen, D., Stallcup, M. R. and Muscat, G. E.** (2002). The coactivator-associated arginine methyltransferase is necessary for muscle differentiation: CARM1 coactivates myocyte enhancer factor-2. *J Biol Chem* **277**, 4324-33.
- Cheng, T., Shen, H., Giokas, D., Gere, J., Tenen, D. G. and Scadden, D. T.** (1996). Temporal mapping of gene expression levels during the differentiation of individual primary hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 13158-63.

- Church, G. M. and Gilbert, W.** (1984). Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 1991-5.
- Clarke, D. L., Johansson, C. B., Wilbertz, J., Veress, B., Nilsson, E., Karlstrom, H., Lendahl, U. and Frisen, J.** (2000). Generalized potential of adult neural stem cells. *Science* **288**, 1660-3.
- Comb, M. and Goodman, H. M.** (1990). CpG methylation inhibits proenkephalin gene expression and binding of the transcription factor AP-2. *Nucleic Acids Res* **18**, 3975-82.
- Cooper, D. N., Taggart, M. H. and Bird, A. P.** (1983). Unmethylated domains in vertebrate DNA. *Nucleic Acids Res* **11**, 647-58.
- Cross, M. A. and Enver, T.** (1997). The lineage commitment of haemopoietic progenitor cells. *Curr Opin Genet Dev* **7**, 609-13.
- Cross, S. H., Meehan, R. R., Nan, X. and Bird, A.** (1997). A component of the transcriptional repressor MeCP1 shares a motif with DNA methyltransferase and HRX proteins. *Nat Genet* **16**, 256-9.
- Davis, R. L., Weintraub, H. and Lassar, A. B.** (1987). Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* **51**, 987-1000.
- de la Serna, I. L., Carlson, K. A. and Imbalzano, A. N.** (2001a). Mammalian SWI/SNF complexes promote MyoD-mediated muscle differentiation. *Nat Genet* **27**, 187-90.
- de la Serna, I. L., Roy, K., Carlson, K. A. and Imbalzano, A. N.** (2001b). MyoD can induce cell cycle arrest but not muscle differentiation in the presence of dominant negative SWI/SNF chromatin remodeling enzymes. *J Biol Chem* **276**, 41486-91.
- De Luca, A., Severino, A., De Paolis, P., Cottone, G., De Luca, L., De Falco, M., Porcellini, A., Volpe, M. and Condorelli, G.** (2003). p300/cAMP-response-element-binding-protein ('CREB')-binding protein (CBP) modulates co-operation between myocyte enhancer factor 2A (MEF2A) and thyroid hormone receptor-retinoid X receptor. *Biochem J* **369**, 477-84.
- Dean, W., Santos, F. and Reik, W.** (2003). Epigenetic reprogramming in early mammalian development and following somatic nuclear transfer. *Semin Cell Dev Biol* **14**, 93-100.
- Delassus, S., Tittley, I. and Enver, T.** (1999). Functional and molecular analysis of hematopoietic progenitors derived from the aorta-gonad-mesonephros region of the mouse embryo. *Blood* **94**, 1495-503.

- Dennis, K., Fan, T., Geiman, T., Yan, Q. and Muegge, K. (2001). Lsh, a member of the SNF2 family, is required for genome-wide methylation. *Genes Dev* **15**, 2940-4.
- Eckner, R., Yao, T. P., Oldread, E. and Livingston, D. M. (1996). Interaction and functional collaboration of p300/CBP and bHLH proteins in muscle and B-cell differentiation. *Genes Dev* **10**, 2478-90.
- Edmondson, D. G., Cheng, T. C., Cserjesi, P., Chakraborty, T. and Olson, E. N. (1992). Analysis of the myogenin promoter reveals an indirect pathway for positive autoregulation mediated by the muscle-specific enhancer factor MEF-2. *Mol Cell Biol* **12**, 3665-77.
- Enver, T. and Greaves, M. (1998). Loops, lineage, and leukemia. *Cell* **94**, 9-12.
- Feil, R. and Khosla, S. (1999). Genomic imprinting in mammals: an interplay between chromatin and DNA methylation? *Trends Genet* **15**, 431-5.
- Felsenfeld, G., Boyes, J., Chung, J., Clark, D. and Studitsky, V. (1996). Chromatin structure and gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 9384-8.
- Ferrari, G., Cusella-De Angelis, G., Coletta, M., Paolucci, E., Stornaiuolo, A., Cossu, G. and Mavilio, F. (1998). Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* **279**, 1528-30.
- Ford, A. M., Bennett, C. A., Healy, L. E., Navarro, E., Spooncer, E. and Greaves, M. F. (1992). Immunoglobulin heavy-chain and CD3 delta-chain gene enhancers are DNase I-hypersensitive in hemopoietic progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 3424-8.
- Ford, A. M., Bennett, C. A., Healy, L. E., Towatari, M., Greaves, M. F. and Enver, T. (1996). Regulation of the myeloperoxidase enhancer binding proteins Pu1, C-EBP alpha, -beta, and -delta during granulocyte-lineage specification. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 10838-43.
- Frommer, M., McDonald, L. E., Millar, D. S., Collis, C. M., Watt, F., Grigg, G. W., Molloy, P. L. and Paul, C. L. (1992). A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 1827-31.
- Fujita, N., Watanabe, S., Ichimura, T., Tsuruzoe, S., Shinkai, Y., Tachibana, M., Chiba, T. and Nakao, M. (2003). Methyl-CpG binding domain 1 (MBD1) interacts with the Suv39h1-HP1 heterochromatic complex for DNA methylation-based transcriptional repression. *J Biol Chem* **278**, 24132-8.

- Fuks, F., Burgers, W. A., Brehm, A., Hughes-Davies, L. and Kouzarides, T. (2000). DNA methyltransferase Dnmt1 associates with histone deacetylase activity. *Nat Genet* **24**, 88-91.
- Fuks, F., Burgers, W. A., Godin, N., Kasai, M. and Kouzarides, T. (2001). Dnmt3a binds deacetylases and is recruited by a sequence-specific repressor to silence transcription. *Embo J* **20**, 2536-44.
- Fuks, F., Hurd, P. J., Deplus, R. and Kouzarides, T. (2003a). The DNA methyltransferases associate with HP1 and the SUV39H1 histone methyltransferase. *Nucleic Acids Res* **31**, 2305-12.
- Fuks, F., Hurd, P. J., Wolf, D., Nan, X., Bird, A. P. and Kouzarides, T. (2003b). The methyl-CpG-binding protein MeCP2 links DNA methylation to histone methylation. *J Biol Chem* **278**, 4035-40.
- Gerber, A. N., Klesert, T. R., Bergstrom, D. A. and Tapscott, S. J. (1997). Two domains of MyoD mediate transcriptional activation of genes in repressive chromatin: a mechanism for lineage determination in myogenesis. *Genes Dev* **11**, 436-50.
- Gibbons, R. J., McDowell, T. L., Raman, S., O'Rourke, D. M., Garrick, D., Ayyub, H. and Higgs, D. R. (2000). Mutations in ATRX, encoding a SWI/SNF-like protein, cause diverse changes in the pattern of DNA methylation. *Nat Genet* **24**, 368-71.
- Grant, M. B., May, W. S., Caballero, S., Brown, G. A., Guthrie, S. M., Mames, R. N., Byrne, B. J., Vaught, T., Spoerri, P. E., Peck, A. B. et al. (2002). Adult hematopoietic stem cells provide functional hemangioblast activity during retinal neovascularization. *Nat Med* **8**, 607-12.
- Gross, D. S. and Garrard, W. T. (1988). Nuclease hypersensitive sites in chromatin. *Annu Rev Biochem* **57**, 159-97.
- Gussoni, E., Soneoka, Y., Strickland, C. D., Buzney, E. A., Khan, M. K., Flint, A. F., Kunkel, L. M. and Mulligan, R. C. (1999). Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* **401**, 390-4.
- Hadchouel, J., Carvajal, J. J., Daubas, P., Bajard, L., Chang, T., Rocancourt, D., Cox, D., Summerbell, D., Tajbakhsh, S., Rigby, P. W. et al. (2003). Analysis of a key regulatory region upstream of the Myf5 gene reveals multiple phases of myogenesis, orchestrated at each site by a combination of elements dispersed throughout the locus. *Development* **130**, 3415-26.
- Han, L., Lin, I. G. and Hsieh, C. L. (2001). Protein binding protects sites on stable episomes and in the chromosome from de novo methylation. *Mol Cell Biol* **21**, 3416-24.

- Hanstein, B., Eckner, R., DiRenzo, J., Halachmi, S., Liu, H., Searcy, B., Kurokawa, R. and Brown, M.** (1996). p300 is a component of an estrogen receptor coactivator complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 11540-5.
- Hark, A. T., Schoenherr, C. J., Katz, D. J., Ingram, R. S., Levorse, J. M. and Tilghman, S. M.** (2000). CTCF mediates methylation-sensitive enhancer-blocking activity at the H19/Igf2 locus. *Nature* **405**, 486-9.
- Hashimshony, T., Zhang, J., Keshet, I., Bustin, M. and Cedar, H.** (2003). The role of DNA methylation in setting up chromatin structure during development. *Nat Genet* **34**, 187-92.
- Heberlein, C., Fischer, K. D., Stoffel, M., Nowock, J., Ford, A., Tessmer, U. and Stocking, C.** (1992). The gene for erythropoietin receptor is expressed in multipotential hematopoietic and embryonal stem cells: evidence for differentiation stage-specific regulation. *Mol Cell Biol* **12**, 1815-26.
- Hendrich, B. and Bird, A.** (1998). Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. *Mol Cell Biol* **18**, 6538-47.
- Hendrich, B., Guy, J., Ramsahoye, B., Wilson, V. A. and Bird, A.** (2001). Closely related proteins MBD2 and MBD3 play distinctive but interacting roles in mouse development. *Genes Dev* **15**, 710-23.
- Hendrich, B., Hardeland, U., Ng, H. H., Jiricny, J. and Bird, A.** (1999). The thymine glycosylase MBD4 can bind to the product of deamination at methylated CpG sites. *Nature* **401**, 301-4.
- Hirt, B.** (1967). Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell cultures. *J Mol Biol* **26**, 365-9.
- Holler, M., Westin, G., Jiricny, J. and Schaffner, W.** (1988). Sp1 transcription factor binds DNA and activates transcription even when the binding site is CpG methylated. *Genes Dev* **2**, 1127-35.
- Holliday, R. and Pugh, J. E.** (1975). DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science* **187**, 226-32.
- Howell, C. Y., Bestor, T. H., Ding, F., Latham, K. E., Mertineit, C., Trasler, J. M. and Chaillet, J. R.** (2001). Genomic imprinting disrupted by a maternal effect mutation in the Dnmt1 gene. *Cell* **104**, 829-38.
- Hsieh, C. L.** (1999). Evidence that protein binding specifies sites of DNA demethylation. *Mol Cell Biol* **19**, 46-56.

- Hsu, D. W., Lin, M. J., Lee, T. L., Wen, S. C., Chen, X. and Shen, C. K. (1999). Two major forms of DNA (cytosine-5) methyltransferase in human somatic tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 9751-6.
- Hu, M., Krause, D., Greaves, M., Sharkis, S., Dexter, M., Heyworth, C. and Enver, T. (1997). Multilineage gene expression precedes commitment in the hemopoietic system. *Genes Dev* **11**, 774-85.
- Humpherys, D., Eggan, K., Akutsu, H., Hochedlinger, K., Rideout, W. M., 3rd, Biniszkiewicz, D., Yanagimachi, R. and Jaenisch, R. (2001). Epigenetic instability in ES cells and cloned mice. *Science* **293**, 95-7.
- Hutchins, A. S., Mullen, A. C., Lee, H. W., Sykes, K. J., High, F. A., Hendrich, B. D., Bird, A. P. and Reiner, S. L. (2002). Gene silencing quantitatively controls the function of a developmental trans-activator. *Mol Cell* **10**, 81-91.
- Jackson, J. P., Lindroth, A. M., Cao, X. and Jacobsen, S. E. (2002). Control of CpNpG DNA methylation by the KRYPTONITE histone H3 methyltransferase. *Nature* **416**, 556-60.
- Jackson, K. A., Majka, S. M., Wang, H., Pocius, J., Hartley, C. J., Majesky, M. W., Entman, M. L., Michael, L. H., Hirschi, K. K. and Goodell, M. A. (2001). Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest* **107**, 1395-402.
- Jackson, K. A., Mi, T. and Goodell, M. A. (1999). Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 14482-6.
- Jeddeloh, J. A., Stokes, T. L. and Richards, E. J. (1999). Maintenance of genomic methylation requires a SWI2/SNF2-like protein. *Nat Genet* **22**, 94-7.
- Jensen, F. C., Girardi, A. J., Gilden, R. V. and Koprowski, H. (1964). Infection of Human and Simian Tissue Cultures with Rous Sarcoma Virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **52**, 53-9.
- Jones, P. L., Veenstra, G. J., Wade, P. A., Vermaak, D., Kass, S. U., Landsberger, N., Strouboulis, J. and Wolffe, A. P. (1998). Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet* **19**, 187-91.
- Jost, J. P., Fremont, M., Siegmann, M. and Hofsteenge, J. (1997). The RNA moiety of chick embryo 5-methylcytosine- DNA glycosylase targets DNA demethylation. *Nucleic Acids Res* **25**, 4545-50.
- Jost, J. P. and Jost, Y. C. (1995). Mechanism of active DNA demethylation during embryonic development and cellular differentiation in vertebrates. *Gene* **157**, 265-6.

- Jost, J. P., Siegmann, M., Sun, L. and Leung, R.** (1995). Mechanisms of DNA demethylation in chicken embryos. Purification and properties of a 5-methylcytosine-DNA glycosylase. *J Biol Chem* **270**, 9734-9.
- Kafri, T., Ariel, M., Brandeis, M., Shemer, R., Urven, L., McCarrey, J., Cedar, H. and Razin, A.** (1992). Developmental pattern of gene-specific DNA methylation in the mouse embryo and germ line. *Genes Dev* **6**, 705-14.
- Kass, S. U., Landsberger, N. and Wolffe, A. P.** (1997a). DNA methylation directs a time-dependent repression of transcription initiation. *Curr Biol* **7**, 157-65.
- Kass, S. U., Pruss, D. and Wolffe, A. P.** (1997b). How does DNA methylation repress transcription? *Trends Genet* **13**, 444-9.
- Kaushal, S., Schneider, J. W., Nadal-Ginard, B. and Mahdavi, V.** (1994). Activation of the myogenic lineage by MEF2A, a factor that induces and cooperates with MyoD. *Science* **266**, 1236-40.
- Keshet, I., Lieman-Hurwitz, J. and Cedar, H.** (1986). DNA methylation affects the formation of active chromatin. *Cell* **44**, 535-43.
- Kirillov, A., Kistler, B., Mostoslavsky, R., Cedar, H., Wirth, T. and Bergman, Y.** (1996). A role for nuclear NF-kappaB in B-cell-specific demethylation of the Igkappa locus. *Nat Genet* **13**, 435-41.
- Klimasauskas, S., Kumar, S., Roberts, R. J. and Cheng, X.** (1994). HhaI methyltransferase flips its target base out of the DNA helix. *Cell* **76**, 357-69.
- Krause, D. S., Theise, N. D., Collector, M. I., Henegariu, O., Hwang, S., Gardner, R., Neutzel, S. and Sharkis, S. J.** (2001). Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* **105**, 369-77.
- Kriaucionis, S. and Bird, A.** (2003). DNA methylation and Rett syndrome. *Hum Mol Genet* **12 Spec No 2**, R221-7.
- Laclef, C., Hamard, G., Demignon, J., Souil, E., Houbbron, C. and Maire, P.** (2003). Altered myogenesis in Six1-deficient mice. *Development* **130**, 2239-52.
- Lagasse, E., Connors, H., Al-Dhalimy, M., Reitsma, M., Dohse, M., Osborne, L., Wang, X., Finegold, M., Weissman, I. L. and Grompe, M.** (2000). Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med* **6**, 1229-34.
- Larsen, F., Gundersen, G., Lopez, R. and Prydz, H.** (1992). CpG islands as gene markers in the human genome. *Genomics* **13**, 1095-107.
- Lassar, A. B., Davis, R. L., Wright, W. E., Kadesch, T., Murre, C., Voronova, A., Baltimore, D. and Weintraub, H.** (1991). Functional activity of myogenic HLH

proteins requires hetero-oligomerization with E12/E47-like proteins in vivo. *Cell* **66**, 305-15.

Lei, H., Oh, S. P., Okano, M., Juttermann, R., Goss, K. A., Jaenisch, R. and Li, E. (1996). De novo DNA cytosine methyltransferase activities in mouse embryonic stem cells. *Development* **122**, 3195-205.

Lemischka, I. (1999). The power of stem cells reconsidered? *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 14193-5.

Leonhardt, H., Page, A. W., Weier, H. U. and Bestor, T. H. (1992). A targeting sequence directs DNA methyltransferase to sites of DNA replication in mammalian nuclei. *Cell* **71**, 865-73.

Lewis, J. D., Meehan, R. R., Henzel, W. J., Maurer-Fogy, I., Jeppesen, P., Klein, F. and Bird, A. (1992). Purification, sequence, and cellular localization of a novel chromosomal protein that binds to methylated DNA. *Cell* **69**, 905-14.

Li, E. (2002). Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat Rev Genet* **3**, 662-73.

Li, E., Beard, C., Forster, A. C., Bestor, T. H. and Jaenisch, R. (1993a). DNA methylation, genomic imprinting, and mammalian development. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **58**, 297-305.

Li, E., Beard, C. and Jaenisch, R. (1993b). Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature* **366**, 362-5.

Li, E., Bestor, T. H. and Jaenisch, R. (1992). Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* **69**, 915-26.

Lichtenstein, M., Keini, G., Cedar, H. and Bergman, Y. (1994). B cell-specific demethylation: a novel role for the intronic kappa chain enhancer sequence. *Cell* **76**, 913-23.

Lin, I. G., Tomzynski, T. J., Ou, Q. and Hsieh, C. L. (2000). Modulation of DNA binding protein affinity directly affects target site demethylation. *Mol Cell Biol* **20**, 2343-9.

Liu, K., Wang, Y. F., Cantemir, C. and Muller, M. T. (2003). Endogenous assays of DNA methyltransferases: Evidence for differential activities of DNMT1, DNMT2, and DNMT3 in mammalian cells in vivo. *Mol Cell Biol* **23**, 2709-19.

Liu, Y., Oakeley, E. J., Sun, L. and Jost, J. P. (1998). Multiple domains are involved in the targeting of the mouse DNA methyltransferase to the DNA replication foci. *Nucleic Acids Res* **26**, 1038-45.

- Lu, J., McKinsey, T. A., Zhang, C. L. and Olson, E. N. (2000).** Regulation of skeletal myogenesis by association of the MEF2 transcription factor with class II histone deacetylases. *Mol Cell* **6**, 233-44.
- Lubbert, M., Miller, C. W. and Koeffler, H. P. (1991).** Changes of DNA methylation and chromatin structure in the human myeloperoxidase gene during myeloid differentiation. *Blood* **78**, 345-56.
- Lucarelli, M., Fuso, A., Strom, R. and Scarpa, S. (2001).** The dynamics of myogenin site-specific demethylation is strongly correlated with its expression and with muscle differentiation. *J Biol Chem* **276**, 7500-6.
- Maier, H., Colbert, J., Fitzsimmons, D., Clark, D. R. and Hagman, J. (2003).** Activation of the early B-cell-specific mb-1 (Ig-alpha) gene by Pax-5 is dependent on an unmethylated Ets binding site. *Mol Cell Biol* **23**, 1946-60.
- Makar, K. W., Perez-Melgosa, M., Shnyreva, M., Weaver, W. M., Fitzpatrick, D. R. and Wilson, C. B. (2003).** Active recruitment of DNA methyltransferases regulates interleukin 4 in thymocytes and T cells. *Nat Immunol* **4**, 1183-90.
- Mal, A., Sturniolo, M., Schiltz, R. L., Ghosh, M. K. and Harter, M. L. (2001).** A role for histone deacetylase HDAC1 in modulating the transcriptional activity of MyoD: inhibition of the myogenic program. *Embo J* **20**, 1739-53.
- Matsuo, K., Silke, J., Georgiev, O., Marti, P., Giovannini, N. and Rungger, D. (1998).** An embryonic demethylation mechanism involving binding of transcription factors to replicating DNA. *Embo J* **17**, 1446-53.
- Mayer, W., Niveleau, A., Walter, J., Fundele, R. and Haaf, T. (2000a).** Demethylation of the zygotic paternal genome. *Nature* **403**, 501-2.
- Mayer, W., Smith, A., Fundele, R. and Haaf, T. (2000b).** Spatial separation of parental genomes in preimplantation mouse embryos. *J Cell Biol* **148**, 629-34.
- McKinsey, T. A., Zhang, C. L., Lu, J. and Olson, E. N. (2000a).** Signal-dependent nuclear export of a histone deacetylase regulates muscle differentiation. *Nature* **408**, 106-11.
- McKinsey, T. A., Zhang, C. L. and Olson, E. N. (2000b).** Activation of the myocyte enhancer factor-2 transcription factor by calcium/calmodulin-dependent protein kinase-stimulated binding of 14-3-3 to histone deacetylase 5. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 14400-5.

- Meehan, R. R., Lewis, J. D., McKay, S., Kleiner, E. L. and Bird, A. P.** (1989). Identification of a mammalian protein that binds specifically to DNA containing methylated CpGs. *Cell* **58**, 499-507.
- Mertineit, C., Yoder, J. A., Taketo, T., Laird, D. W., Trasler, J. M. and Bestor, T. H.** (1998). Sex-specific exons control DNA methyltransferase in mammalian germ cells. *Development* **125**, 889-97.
- Mezey, E., Chandross, K. J., Harta, G., Maki, R. A. and McKercher, S. R.** (2000). Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science* **290**, 1779-82.
- Millar, C. B., Guy, J., Sansom, O. J., Selfridge, J., MacDougall, E., Hendrich, B., Keightley, P. D., Bishop, S. M., Clarke, A. R. and Bird, A.** (2002). Enhanced CpG mutability and tumorigenesis in MBD4-deficient mice. *Science* **297**, 403-5.
- Miner, J. H. and Wold, B.** (1990). Herculín, a fourth member of the MyoD family of myogenic regulatory genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 1089-93.
- Miura, A., Yonebayashi, S., Watanabe, K., Toyama, T., Shimada, H. and Kakutani, T.** (2001). Mobilization of transposons by a mutation abolishing full DNA methylation in Arabidopsis. *Nature* **411**, 212-4.
- Molkentin, J. D. and Olson, E. N.** (1996). Combinatorial control of muscle development by basic helix-loop-helix and MADS-box transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 9366-73.
- Monk, M., Boubelik, M. and Lehnert, S.** (1987). Temporal and regional changes in DNA methylation in the embryonic, extraembryonic and germ cell lineages during mouse embryo development. *Development* **99**, 371-82.
- Morrison, S. J., Wandycz, A. M., Hemmati, H. D., Wright, D. E. and Weissman, I. L.** (1997). Identification of a lineage of multipotent hematopoietic progenitors. *Development* **124**, 1929-39.
- Mostoslavsky, R. and Bergman, Y.** (1997). DNA methylation: regulation of gene expression and role in the immune system. *Biochim Biophys Acta* **1333**, F29-50.
- Nan, X., Campoy, F. J. and Bird, A.** (1997). MeCP2 is a transcriptional repressor with abundant binding sites in genomic chromatin. *Cell* **88**, 471-81.
- Nan, X., Meehan, R. R. and Bird, A.** (1993). Dissection of the methyl-CpG binding domain from the chromosomal protein MeCP2. *Nucleic Acids Res* **21**, 4886-92.

- Nan, X., Ng, H. H., Johnson, C. A., Laherty, C. D., Turner, B. M., Eisenman, R. N. and Bird, A. (1998). Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* **393**, 386-9.
- Nan, X., Tate, P., Li, E. and Bird, A. (1996). DNA methylation specifies chromosomal localization of MeCP2. *Mol Cell Biol* **16**, 414-21.
- Ng, H. H., Jeppesen, P. and Bird, A. (2000). Active repression of methylated genes by the chromosomal protein MBD1. *Mol Cell Biol* **20**, 1394-406.
- Ng, H. H., Zhang, Y., Hendrich, B., Johnson, C. A., Turner, B. M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Reinberg, D. and Bird, A. (1999). MBD2 is a transcriptional repressor belonging to the MeCP1 histone deacetylase complex. *Nat Genet* **23**, 58-61.
- Ngo, V., Gourdji, D. and Laverriere, J. N. (1996). Site-specific methylation of the rat prolactin and growth hormone promoters correlates with gene expression. *Mol Cell Biol* **16**, 3245-54.
- Okano, M., Bell, D. W., Haber, D. A. and Li, E. (1999). DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* **99**, 247-57.
- Okano, M., Xie, S. and Li, E. (1998a). Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nat Genet* **19**, 219-20.
- Okano, M., Xie, S. and Li, E. (1998b). Dnmt2 is not required for de novo and maintenance methylation of viral DNA in embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res* **26**, 2536-40.
- Olson, E. N., Perry, M. and Schulz, R. A. (1995). Regulation of muscle differentiation by the MEF2 family of MADS box transcription factors. *Dev Biol* **172**, 2-14.
- Orkin, S. H. and Zon, L. I. (1997). Genetics of erythropoiesis: induced mutations in mice and zebrafish. *Annu Rev Genet* **31**, 33-60.
- Orlic, D., Kajstura, J., Chimenti, S., Jakoniuk, I., Anderson, S. M., Li, B., Pickel, J., McKay, R., Nadal-Ginard, B., Bodine, D. M. et al. (2001). Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* **410**, 701-5.
- Osawa, M., Nakamura, K., Nishi, N., Takahasi, N., Tokuomoto, Y., Inoue, H. and Nakauchi, H. (1996). In vivo self-renewal of c-Kit⁺ Sca-1⁺ Lin(low/-) hemopoietic stem cells. *J Immunol* **156**, 3207-14.

- Oswald, J., Engemann, S., Lane, N., Mayer, W., Olek, A., Fundele, R., Dean, W., Reik, W. and Walter, J. (2000). Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote. *Curr Biol* **10**, 475-8.
- Ott, M. O., Bober, E., Lyons, G., Arnold, H. and Buckingham, M. (1991). Early expression of the myogenic regulatory gene, myf-5, in precursor cells of skeletal muscle in the mouse embryo. *Development* **111**, 1097-107.
- Paroush, Z., Keshet, I., Yisraeli, J. and Cedar, H. (1990). Dynamics of demethylation and activation of the alpha-actin gene in myoblasts. *Cell* **63**, 1229-37.
- Polesskaya, A., Naguibneva, I., Fritsch, L., Duquet, A., Ait-Si-Ali, S., Robin, P., Vervisch, A., Pritchard, L. L., Cole, P. and Harel-Bellan, A. (2001). CBP/p300 and muscle differentiation: no HAT, no muscle. *Embo J* **20**, 6816-25.
- Pradhan, S., Bacolla, A., Wells, R. D. and Roberts, R. J. (1999). Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. I. Expression, purification, and comparison of de novo and maintenance methylation. *J Biol Chem* **274**, 33002-10.
- Prokhortchouk, A., Hendrich, B., Jorgensen, H., Ruzov, A., Wilm, M., Georgiev, G., Bird, A. and Prokhortchouk, E. (2001). The p120 catenin partner Kaiso is a DNA methylation-dependent transcriptional repressor. *Genes Dev* **15**, 1613-8.
- Puri, P. L., Avantaggiati, M. L., Balsano, C., Sang, N., Graessmann, A., Giordano, A. and Levrero, M. (1997a). p300 is required for MyoD-dependent cell cycle arrest and muscle-specific gene transcription. *Embo J* **16**, 369-83.
- Puri, P. L., Sartorelli, V., Yang, X. J., Hamamori, Y., Ogryzko, V. V., Howard, B. H., Kedes, L., Wang, J. Y., Graessmann, A., Nakatani, Y. et al. (1997b). Differential roles of p300 and PCAF acetyltransferases in muscle differentiation. *Mol Cell* **1**, 35-45.
- Raich, N. and Romeo, P. H. (1993). Erythroid regulatory elements. *Stem Cells* **11**, 95-104.
- Ramchandani, S., Bhattacharya, S. K., Cervoni, N. and Szyf, M. (1999). DNA methylation is a reversible biological signal. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 6107-12.
- Rand, E. and Cedar, H. (2003). Regulation of imprinting: A multi-tiered process. *J Cell Biochem* **88**, 400-7.
- Razin, A. (1998). CpG methylation, chromatin structure and gene silencing-a three-way connection. *Embo J* **17**, 4905-8.
- Reese, B. E., Bachman, K. E., Baylin, S. B. and Rountree, M. R. (2003). The methyl-CpG binding protein MBD1 interacts with the p150 subunit of chromatin assembly factor 1. *Mol Cell Biol* **23**, 3226-36.

- Reik, W. and Dean, W.** (2001). DNA methylation and mammalian epigenetics. *Electrophoresis* **22**, 2838-43.
- Reik, W. and Dean, W.** (2003). Gene expression: Silent clones speak up. *Nature* **423**, 390-1.
- Reik, W., Dean, W. and Walter, J.** (2001). Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* **293**, 1089-93.
- Rhodes, S. J. and Konieczny, S. F.** (1989). Identification of MRF4: a new member of the muscle regulatory factor gene family. *Genes Dev* **3**, 2050-61.
- Riggs, A. D.** (1975). X inactivation, differentiation, and DNA methylation. *Cytogenet Cell Genet* **14**, 9-25.
- Robertson, K. D., Ait-Si-Ali, S., Yokochi, T., Wade, P. A., Jones, P. L. and Wolffe, A. P.** (2000a). DNMT1 forms a complex with Rb, E2F1 and HDAC1 and represses transcription from E2F-responsive promoters. *Nat Genet* **25**, 338-42.
- Robertson, K. D., Keyomarsi, K., Gonzales, F. A., Velicescu, M. and Jones, P. A.** (2000b). Differential mRNA expression of the human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b during the G(0)/G(1) to S phase transition in normal and tumor cells. *Nucleic Acids Res* **28**, 2108-13.
- Ronchi, A., Ciro, M., Cairns, L., Basilico, L., Corbella, P., Ricciardi-Castagnoli, P., Cross, M., Ghysdael, J. and Ottolenghi, S.** (1997). Molecular heterogeneity of regulatory elements of the mouse GATA-1 gene. *Genes Funct* **1**, 245-58.
- Ross, J., Gielen, J., Packman, S., Ikawa, Y. and Leder, P.** (1974). Globin gene expression in cultured erythroleukemic cells. *J Mol Biol* **87**, 697-714.
- Rossant, J., Sanford, J. P., Chapman, V. M. and Andrews, G. K.** (1986). Undermethylation of structural gene sequences in extraembryonic lineages of the mouse. *Dev Biol* **117**, 567-73.
- Rougier, N., Bourc'his, D., Gomes, D. M., Niveleau, A., Plachot, M., Paldi, A. and Viegas-Pequignot, E.** (1998). Chromosome methylation patterns during mammalian preimplantation development. *Genes Dev* **12**, 2108-13.
- Rountree, M. R., Bachman, K. E. and Baylin, S. B.** (2000). DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci. *Nat Genet* **25**, 269-77.
- Russo, V. E. A., Martienssen, R. A. and Riggs, A. D.** (1996). Epigenetic mechanisms of gene regulation. In *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY*, (ed).

- Sado, T., Fenner, M. H., Tan, S. S., Tam, P., Shioda, T. and Li, E. (2000). X inactivation in the mouse embryo deficient for Dnmt1: distinct effect of hypomethylation on imprinted and random X inactivation. *Dev Biol* **225**, 294-303.
- Sakai, E., Bottaro, A. and Alt, F. W. (1999a). The Ig heavy chain intronic enhancer core region is necessary and sufficient to promote efficient class switch recombination. *Int Immunol* **11**, 1709-13.
- Sakai, E., Bottaro, A., Davidson, L., Sleckman, B. P. and Alt, F. W. (1999b). Recombination and transcription of the endogenous Ig heavy chain locus is effected by the Ig heavy chain intronic enhancer core region in the absence of the matrix attachment regions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 1526-31.
- Saluz, H. P., Feavers, I. M., Jiricny, J. and Jost, J. P. (1988). Genomic sequencing and in vivo footprinting of an expression-specific DNase I-hypersensitive site of avian vitellogenin II promoter reveal a demethylation of a mCpG and a change in specific interactions of proteins with DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 6697-700.
- Saluz, H. P., Jiricny, J. and Jost, J. P. (1986). Genomic sequencing reveals a positive correlation between the kinetics of strand-specific DNA demethylation of the overlapping estradiol/glucocorticoid-receptor binding sites and the rate of avian vitellogenin mRNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 7167-71.
- Sanford, J. P., Clark, H. J., Chapman, V. M. and Rossant, J. (1987). Differences in DNA methylation during oogenesis and spermatogenesis and their persistence during early embryogenesis in the mouse. *Genes Dev* **1**, 1039-46.
- Santi, D. V., Garrett, C. E. and Barr, P. J. (1983). On the mechanism of inhibition of DNA-cytosine methyltransferases by cytosine analogs. *Cell* **33**, 9-10.
- Santos, F., Hendrich, B., Reik, W. and Dean, W. (2002). Dynamic reprogramming of DNA methylation in the early mouse embryo. *Dev Biol* **241**, 172-82.
- Sartorelli, V., Huang, J., Hamamori, Y. and Kedes, L. (1997). Molecular mechanisms of myogenic coactivation by p300: direct interaction with the activation domain of MyoD and with the MADS box of MEF2C. *Mol Cell Biol* **17**, 1010-26.
- Sassoon, D., Lyons, G., Wright, W. E., Lin, V., Lassar, A., Weintraub, H. and Buckingham, M. (1989). Expression of two myogenic regulatory factors myogenin and MyoD1 during mouse embryogenesis. *Nature* **341**, 303-7.
- Schubeler, D., Lorincz, M. C., Cimbora, D. M., Telling, A., Feng, Y. Q., Bouhassira, E. E. and Groudine, M. (2000). Genomic targeting of methylated DNA:

influence of methylation on transcription, replication, chromatin structure, and histone acetylation. *Mol Cell Biol* **20**, 9103-12.

Selker, E. U., Tountas, N. A., Cross, S. H., Margolin, B. S., Murphy, J. G., Bird, A. P. and Freitag, M. (2003). The methylated component of the *Neurospora crassa* genome. *Nature* **422**, 893-7.

Severne, Y., Wieland, S., Schaffner, W. and Rusconi, S. (1988). Metal binding 'finger' structures in the glucocorticoid receptor defined by site-directed mutagenesis. *Embo J* **7**, 2503-8.

Shivdasani, R. A. and Orkin, S. H. (1996). The transcriptional control of hematopoiesis. *Blood* **87**, 4025-39.

Singer, T., Yordan, C. and Martienssen, R. A. (2001). Robertson's Mutator transposons in *A. thaliana* are regulated by the chromatin-remodeling gene Decrease in DNA Methylation (DDM1). *Genes Dev* **15**, 591-602.

Spitz, F., Demignon, J., Porteu, A., Kahn, A., Concordet, J. P., Daegelen, D. and Maire, P. (1998). Expression of myogenin during embryogenesis is controlled by Six/sine oculis homeoproteins through a conserved MEF3 binding site. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 14220-5.

Stamatoyannopoulos, J. A., Goodwin, A., Joyce, T. and Lowrey, C. H. (1995). NF-E2 and GATA binding motifs are required for the formation of DNase I hypersensitive site 4 of the human beta-globin locus control region. *Embo J* **14**, 106-16.

Stancheva, I., El-Maarri, O., Walter, J., Niveleau, A. and Meehan, R. R. (2002). DNA methylation at promoter regions regulates the timing of gene activation in *Xenopus laevis* embryos. *Dev Biol* **243**, 155-65.

Stancheva, I. and Meehan, R. R. (2000). Transient depletion of xDnmt1 leads to premature gene activation in *Xenopus* embryos. *Genes Dev* **14**, 313-27.

Storb, U., Arp, B. and Wilson, R. (1981). The switch region associated with immunoglobulin C mu genes is DNase I hypersensitive in T lymphocytes. *Nature* **294**, 90-2.

Sullivan, C. H. and Grainger, R. M. (1987). Delta-crystallin genes become hypomethylated in postmitotic lens cells during chicken development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 329-33.

Summerbell, D., Halai, C. and Rigby, P. W. (2002). Expression of the myogenic regulatory factor Mrf4 precedes or is contemporaneous with that of Myf5 in the somitic bud. *Mech Dev* **117**, 331-5.

- Swisher, J. F., Rand, E., Cedar, H. and Marie Pyle, A. (1998). Analysis of putative RNase sensitivity and protease insensitivity of demethylation activity in extracts from rat myoblasts. *Nucleic Acids Res* **26**, 5573-80.
- Szyf, M., Bozovic, V. and Tanigawa, G. (1991). Growth regulation of mouse DNA methyltransferase gene expression. *J Biol Chem* **266**, 10027-30.
- Szyf, M., Rouleau, J., Theberge, J. and Bozovic, V. (1992). Induction of myogenic differentiation by an expression vector encoding the DNA methyltransferase cDNA sequence in the antisense orientation. *J Biol Chem* **267**, 12831-6.
- Tamaru, H. and Selker, E. U. (2001). A histone H3 methyltransferase controls DNA methylation in *Neurospora crassa*. *Nature* **414**, 277-83.
- Tate, P., Skarnes, W. and Bird, A. (1996). The methyl-CpG binding protein MeCP2 is essential for embryonic development in the mouse. *Nat Genet* **12**, 205-8.
- Taylor, S. M. and Jones, P. A. (1982). Changes in phenotypic expression in embryonic and adult cells treated with 5-azacytidine. *J Cell Physiol* **111**, 187-94.
- Tazi, J. and Bird, A. (1990). Alternative chromatin structure at CpG islands. *Cell* **60**, 909-20.
- Terada, N., Hamazaki, T., Oka, M., Hoki, M., Mastalerz, D. M., Nakano, Y., Meyer, E. M., Morel, L., Petersen, B. E. and Scott, E. W. (2002). Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* **416**, 542-5.
- Thomassin, H., Flavin, M., Espinas, M. L. and Grange, T. (2001). Glucocorticoid-induced DNA demethylation and gene memory during development. *Embo J* **20**, 1974-83.
- Tompa, R., McCallum, C. M., Delrow, J., Henikoff, J. G., van Steensel, B. and Henikoff, S. (2002). Genome-wide profiling of DNA methylation reveals transposon targets of CHROMOMETHYLASE3. *Curr Biol* **12**, 65-8.
- Tycko, B. and Ashkenas, J. (2000). Epigenetics and its role in disease. *J Clin Invest* **105**, 245-6.
- Verfaillie, C. M. (2002). Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. *Trends Cell Biol* **12**, 502-8.
- Wade, P. A., Geggion, A., Jones, P. L., Ballestar, E., Aubry, F. and Wolffe, A. P. (1999). Mi-2 complex couples DNA methylation to chromatin remodelling and histone deacetylation. *Nat Genet* **23**, 62-6.

- Wagers, A. J., Sherwood, R. I., Christensen, J. L. and Weissman, I. L.** (2002). Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. *Science* **297**, 2256-9.
- Walsh, C. P. and Bestor, T. H.** (1999). Cytosine methylation and mammalian development. *Genes Dev* **13**, 26-34.
- Walsh, C. P., Chaillet, J. R. and Bestor, T. H.** (1998). Transcription of IAP endogenous retroviruses is constrained by cytosine methylation. *Nat Genet* **20**, 116-7.
- Wang, J., Mager, J., Chen, Y., Schneider, E., Cross, J. C., Nagy, A. and Magnuson, T.** (2001). Imprinted X inactivation maintained by a mouse Polycomb group gene. *Nat Genet* **28**, 371-5.
- Weih, F., Nitsch, D., Reik, A., Schutz, G. and Becker, P. B.** (1991). Analysis of CpG methylation and genomic footprinting at the tyrosine aminotransferase gene: DNA methylation alone is not sufficient to prevent protein binding in vivo. *Embo J* **10**, 2559-67.
- Weiss, A., Keshet, I., Razin, A. and Cedar, H.** (1996). DNA demethylation in vitro: involvement of RNA. *Cell* **86**, 709-18.
- Weissman, I. L., Anderson, D. J. and Gage, F.** (2001). Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annu Rev Cell Dev Biol* **17**, 387-403.
- Wolffe, A. P., Jones, P. L. and Wade, P. A.** (1999). DNA demethylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 5894-6.
- Wright, W. E., Sassoon, D. A. and Lin, V. K.** (1989). Myogenin, a factor regulating myogenesis, has a domain homologous to MyoD. *Cell* **56**, 607-17.
- Yaffe, D. and Saxel, O.** (1977). A myogenic cell line with altered serum requirements for differentiation. *Differentiation* **7**, 159-66.
- Yee, S. P. and Rigby, P. W.** (1993). The regulation of myogenin gene expression during the embryonic development of the mouse. *Genes Dev* **7**, 1277-89.
- Ying, Q. L., Nichols, J., Evans, E. P. and Smith, A. G.** (2002). Changing potency by spontaneous fusion. *Nature* **416**, 545-8.
- Yoder, J. A. and Bestor, T. H.** (1998). A candidate mammalian DNA methyltransferase related to pmt1p of fission yeast. *Hum Mol Genet* **7**, 279-84.
- Yoder, J. A., Soman, N. S., Verdine, G. L. and Bestor, T. H.** (1997a). DNA (cytosine-5)-methyltransferases in mouse cells and tissues. Studies with a mechanism-based probe. *J Mol Biol* **270**, 385-95.

- Yoder, J. A., Walsh, C. P. and Bestor, T. H.** (1997b). Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet* **13**, 335-40.
- Yoon, H. G., Chan, D. W., Reynolds, A. B., Qin, J. and Wong, J.** (2003). N-CoR mediates DNA methylation-dependent repression through a methyl CpG binding protein Kaiso. *Mol Cell* **12**, 723-34.
- Yousoufian, H.** (1994). Further characterization of cis-acting regulatory sequences in the genomic locus of the murine erythropoietin receptor: evidence for stage-specific regulation. *Blood* **83**, 1428-35.
- Yuan, W., Condorelli, G., Caruso, M., Felsani, A. and Giordano, A.** (1996). Human p300 protein is a coactivator for the transcription factor MyoD. *J Biol Chem* **271**, 9009-13.
- Zhang, C. L., McKinsey, T. A. and Olson, E. N.** (2002). Association of class II histone deacetylases with heterochromatin protein 1: potential role for histone methylation in control of muscle differentiation. *Mol Cell Biol* **22**, 7302-12.
- Zhang, W., Behringer, R. R. and Olson, E. N.** (1995). Inactivation of the myogenic bHLH gene MRF4 results in up-regulation of myogenin and rib anomalies. *Genes Dev* **9**, 1388-99.
- Zhang, Y., Ng, H. H., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Bird, A. and Reinberg, D.** (1999). Analysis of the NuRD subunits reveals a histone deacetylase core complex and a connection with DNA methylation. *Genes Dev* **13**, 1924-35.
- Zhao, X., Ueba, T., Christie, B. R., Barkho, B., McConnell, M. J., Nakashima, K., Lein, E. S., Eadie, B. D., Willhoite, A. R., Muotri, A. R. et al.** (2003). Mice lacking methyl-CpG binding protein 1 have deficits in adult neurogenesis and hippocampal function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 6777-82.
- Zhou, Y., Cambareri, E. B. and Kinsey, J. A.** (2001). DNA methylation inhibits expression and transposition of the *Neurospora* Tad retrotransposon. *Mol Genet Genomics* **265**, 748-54.
- Zhu, B., Zheng, Y., Anglikar, H., Schwarz, S., Thiry, S., Siegmann, M. and Jost, J. P.** (2000a). 5-Methylcytosine DNA glycosylase activity is also present in the human MBD4 (G/T mismatch glycosylase) and in a related avian sequence. *Nucleic Acids Res* **28**, 4157-65.
- Zhu, B., Zheng, Y., Hess, D., Anglikar, H., Schwarz, S., Siegmann, M., Thiry, S. and Jost, J. P.** (2000b). 5-methylcytosine-DNA glycosylase activity is present in a

cloned G/T mismatch DNA glycosylase associated with the chicken embryo DNA demethylation complex. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 5135-9.

Zhu, J., Bennett, C. A., MacGregor, A. D., Greaves, M. F., Goodwin, G. H. and Ford, A. M. (1994). A myeloid-lineage-specific enhancer upstream of the mouse myeloperoxidase (MPO) gene. *Leukemia* **8**, 717-23.

Zhu, W. G., Srinivasan, K., Dai, Z., Duan, W., Druhan, L. J., Ding, H., Yee, L., Villalona-Calero, M. A., Plass, C. and Otterson, G. A. (2003). Methylation of adjacent CpG sites affects Sp1/Sp3 binding and activity in the p21(Cip1) promoter. *Mol Cell Biol* **23**, 4056-65.

Reunido el Tribunal que suscribe en el día de la
fecha, acordó calificar la presente Tesis Doctoral
con la censura de Sabrosaliente "Cum laude"

Madrid, 19-Febrero-2004

Américo Cans

José

L. Angerere

Juan Rey

Bilal Santisteban

TESIS DOCTORAL